

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 259**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.08.2007 PCT/GB2007/050515**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2008 WO08026010**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2007 E 07804427 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 2069793**

54 Título: **Identificación de proteína asociada con carcinoma hepatocelular, glioblastoma y cáncer de pulmón**

30 Prioridad:

29.08.2006 GB 0616967
06.09.2006 US 842429 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.07.2017

73 Titular/es:

OXFORD BIOTHERAPEUTICS LTD (100.0%)
94A Innovation Drive, Milton Park, Abingdon
Oxfordshire OX14 4RZ, GB

72 Inventor/es:

ROHLFF, CHRISTIAN

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 625 259 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

Identificación de proteína asociada con carcinoma hepatocelular, glioblastoma y cáncer de pulmón

Introducción

5 La presente invención se refiere a la identificación de una proteína de membrana asociada con glioblastoma y cáncer de pulmón que tiene utilidad como marcador para glioblastoma y cáncer de pulmón y metástasis de cáncer de pulmón y que también forma un blanco biológico contra el cual se pueden elaborar anticuerpos terapéuticos (u otros reactivos de afinidad tales como Aficuerpos, Nanocuerpos o Unicuerpos) u otros agentes farmacéuticos.

Antecedentes de la invención

Glioblastoma

10 El glioblastoma, también conocido como glioblastoma multiforme, puede desarrollarse a partir de un astrocitoma difuso o un astrocitoma anaplásico, pero más comúnmente se presenta de nueva procedencia sin evidencia de un precursor menos maligno. Histológicamente, este tumor es un glioma celular anaplásico compuesto por células tumorales astrocíticas mal diferenciadas, a menudo pleomórficas, con marcada atipia nuclear y actividad mitótica aguda. El glioblastoma afecta principalmente a los hemisferios cerebrales. Los tumores del SNC se asocian con patrones característicos de oncogenes alterados, genes supresores de tumores alterados y anomalías cromosómicas.

15 El glioblastoma representa aproximadamente del 12% al 15% de todos los tumores cerebrales (que representan del 85% al 90% de todos los tumores primarios del sistema nervioso central (SNC)). Los nuevos casos de tumores del SNC en EE. UU. Son de aproximadamente 18.800 (6,6 por cada 100.000 personas) al año, con alrededor de 12.800 muertes (4,7 por cada 100.000 personas). Este tipo de cáncer representa aproximadamente el 1,3% de todos los cánceres y el 2,2% de todas las muertes relacionadas con el cáncer en los Estados Unidos. En todo el mundo, hay aproximadamente 176.000 nuevos casos de tumores de cerebro y otros tumores del SNC al año, con una mortalidad estimada de 128.000. En general, la incidencia de tumores cerebrales primarios es mayor en los blancos que en los negros, y la mortalidad es mayor en los hombres que en las mujeres. La incidencia máxima se produce entre las edades de 45 y 70 años.

20 Los tumores cerebrales primarios raramente se extienden a otras áreas del cuerpo, pero pueden propagarse a otras partes del cerebro y al eje espinal. La mayoría de los pacientes con neoplasias del sistema nervioso central (SNC) no viven lo suficiente como para desarrollar enfermedad metastásica.

Diagnóstico de glioblastoma:

30 La tomografía computarizada (TC) y la imagenología de resonancia magnética (RM) tienen funciones complementarias en el diagnóstico de neoplasias del SNC. La angiografía también se puede utilizar en el diagnóstico. En la imagenología posterior a la terapia, la tomografía computarizada de emisión de fotones individuales (SPECT) y la tomografía de emisión de positrones (PET) pueden ser útiles para diferenciar la recurrencia tumoral de la necrosis por radiación. A continuación, se realiza un diagnóstico definitivo realizando una biopsia.

Estadificación de los glioblastomas:

35 Los glioblastomas están entre las neoplasias humanas malignas más agresivas, con un pronóstico medio de supervivencia de los pacientes con glioblastoma primario de menos de 1 año. En la clasificación de la OMS de los tumores del sistema nervioso de grado I a grado IV, el glioblastoma se clasifica como grado IV. La tasa de supervivencia a los 5 años para los pacientes con glioblastoma mayores de 45 años es de 2% o menos.

Tratamiento del glioblastoma:

40 La velocidad de curación para el glioblastoma es muy baja con el tratamiento local estándar. El primer paso en la mayoría de los casos es la extirpación quirúrgica por craneotomía de la mayor cantidad de tumor que sea segura sin destruir la función normal. Los glioblastomas no se curan mediante cirugía porque las células del tumor llegan demasiado lejos dentro del tejido cerebral circundante normal. Sin embargo, la cirugía reduce la presión del tumor contra el resto del cerebro y puede prolongar la vida aun cuando todo el tumor no pueda ser removido.

45 La radioterapia (radiación de haz externo, radioterapia intersticial, terapia conformacional tridimensional, radiocirugía estereotáctica o braquiterapia) puede aumentar la tasa de curación o prolongar la supervivencia libre de enfermedad. La radioterapia también puede ser útil en el tratamiento de recidivas en pacientes tratados inicialmente solo con cirugía. La terapia puede incluir polímero impregnado de carmustina implantado quirúrgicamente combinado con radioterapia de haz externo postoperatorio (EBRT).

50 La quimioterapia se administra habitualmente junto con o después de la radioterapia y puede prolongar la supervivencia. Los agentes quimioterapéuticos utilizados incluyen temozolomida, BCNU (carmustina) y cisplatino. Se ha demostrado que los inhibidores del factor de crecimiento erlotinib (Tarceva) y gefitinib (Iressa) reducen los tumores en algunos pacientes.

Las nuevas terapias biológicas bajo evaluación clínica para pacientes con tumores cerebrales incluyen la vacunación de células dendríticas, inhibidores de receptores de tirosina quinasa, inhibidores de farnesil transferasa, terapia génica basada en virus y virus oncolíticos.

Cáncer de pulmón

5 El cáncer de pulmón es la forma más común de cáncer en todo el mundo (que representa alrededor del 12% de los casos de cáncer) y la principal causa de muerte por cáncer (que representa aproximadamente el 18% de las muertes). La incidencia mundial de cáncer de pulmón es de más de 1.300.000 por año, con el número de muertes de más de 1.100.000. En los EE. UU., hay alrededor de 170.000 nuevos casos por año (alrededor del 13% de todos los cánceres), con alrededor de 160.000 muertes (alrededor del 28% de las muertes por cáncer). El cáncer de pulmón es mucho más frecuente entre los hombres que entre las mujeres. Casi el 70% de las personas diagnosticadas con cáncer de pulmón son mayores de 65 años; menos del 3% de todos los casos se encuentran en personas menores de 45 años. Alrededor del 15% de todos los cánceres de pulmón son del tipo de células pequeñas (SCLC), que tienden a extenderse ampliamente a través del cuerpo, mientras que el 85% restante no son células pequeñas (NSCLC). Se estima que aproximadamente US \$ 9.600 millones se gastan en los Estados Unidos cada año en el tratamiento del cáncer de pulmón.

Diagnóstico del cáncer de pulmón

20 El cáncer de pulmón es una enfermedad potencialmente mortal porque a menudo se produce metástasis incluso antes de que pueda detectarse en una radiografía de tórax. Por lo general, los síntomas de cáncer de pulmón no aparecen hasta que la enfermedad está en una etapa avanzada. Hasta el momento, no hay una prueba de detección que se haya demostrado que mejore la posibilidad de una persona de lograr la cura. Pruebas de imagenología tales como una radiografía de tórax, tomografía computarizada, escáner de resonancia magnética o escáner de PET se pueden utilizar para detectar el cáncer de pulmón. A continuación, se realizan pruebas para confirmar el diagnóstico e incluyen citología del esputo, biopsia con aguja, broncoscopia, ultrasonido endobronquial y recuento sanguíneo completo (CBC).

Estadificación del cáncer de pulmón

25 Casi el 60% de las personas diagnosticadas con cáncer de pulmón mueren en el plazo de un año a partir del diagnóstico; 75% mueren en 2 años. La tasa de supervivencia de 5 años para las personas diagnosticadas con NSCLC es de aproximadamente 15%; para SCLC la tasa de supervivencia de 5 años es de aproximadamente 6%. La estadificación del NSCLC se realiza mediante el sistema TNM de la American Joint Committee on Cancer (AJCC) - Etapa 0 - Etapa IV. Las tasas de supervivencia de 5 años por etapas son las siguientes: etapa I: 47%; etapa II: 26%; etapa III: 8% y etapa IV: 2%. SCLC tiene un sistema de 2 etapas - etapa limitada y etapa extendida. Alrededor de dos tercios de los pacientes con SCLC tienen una enfermedad extendida en el momento del diagnóstico. Si el SCLC se encuentra muy temprano y se localiza en el pulmón solamente, la tasa de supervivencia de 5 años es de alrededor del 21%, pero sólo el 6% de los pacientes caen en esta categoría. Cuando el cáncer se ha diseminado, la supervivencia de 5 años es de alrededor del 11%. Para los pacientes con enfermedad extendida, la supervivencia a los 5 años es sólo del 2%.

Tratamiento del cáncer de pulmón

40 La cirugía es el único método confiable para curar NSCLC. Los tipos de cirugía incluyen lobectomía, neumonectomía, segmentectomía y cirugía torácica asistida por video (para tumores pequeños). La radioterapia de haz externo se utiliza a veces como el tratamiento primario, especialmente si la salud del paciente es demasiado pobre para someterse a cirugía. La radioterapia también se puede utilizar después de la cirugía. La quimioterapia se puede administrar como tratamiento primario o como un adyuvante para la cirugía. La terapia dirigida usando antagonistas del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) tales como gefitinib o erlotinib también puede administrarse después de que otros tratamientos hayan fallado. Se ha descubierto que los fármacos antiangiogénicos, como el bevacizumab, prolongan la supervivencia de los pacientes con cáncer de pulmón avanzado. La terapia fotodinámica también se está investigando como un tratamiento para el cáncer de pulmón.

45 El tratamiento principal para SCLC es quimioterapia, ya sea sola o en combinación con radioterapia de haz externo y muy raramente, cirugía.

Los agentes quimioterapéuticos usados para NSCLC y SCLC incluyen cisplatino, carboplatino, mitomicina C, ifosfamida, vinblastina, gemcitabina, etopósido, vinorelbina, paclitaxel, docetaxel e irinotecano.

50 Desafíos terapéuticos

55 Los principales retos en el tratamiento de los cánceres mencionados anteriormente son mejorar las tasas de detección temprana, encontrar nuevos marcadores no invasivos que puedan usarse para seguir el avance de la enfermedad e identificar la recaída, y encontrar terapias mejoradas y menos tóxicas, especialmente para enfermedad más avanzada donde 5 años de supervivencia sigue siendo pobre. Existe una gran necesidad de identificar objetivos que sean más específicos para las células cancerosas, por ejemplo, las que se expresan en la superficie de las células tumorales de manera que puedan ser atacadas por nuevos métodos prometedores tales como inmunoterapéuticos y toxinas dirigidas.

El documento WO2006/090750 describe un anticuerpo anti-IgSF4 como medio para tratar el cáncer.

El documento WO2005/032495 se refiere a perfiles de expresión génica para cáncer de pulmón y a métodos y composiciones para ensayos de diagnóstico para detectar cáncer y métodos y composiciones terapéuticas para tratar cáncer.

5 Los documentos US6596493 y WO02/14557 describen métodos para detectar un trastorno proliferativo celular asociado con TSLC1 y métodos para tratar tales trastornos poniendo en contacto células de un paciente que sufren del trastorno con una cantidad terapéuticamente eficaz de un reactivo que modula el nivel de TSLC1 en las células en proliferación.

10 Sussan et al. (Mol. Cancer, 2005, volumen 4, no. 1:28, págs. 1-10) revela que TSLC1 altera las propiedades de crecimiento tumorigénico y la expresión génica. Zhou et al. (Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes, 2005, Vol. 1669, edición 2, páginas 142-154) describe la clonación y caracterización de moléculas de tipo 1 de nectina humana y de ratón (NECL1).

El documento WO2006/089091 describe métodos y composiciones para identificar marcadores de enfermedad residual mínima, así como marcadores de células metastásicas.

Sumario de la invención

15 La presente invención proporciona terapia de cáncer de pulmón de células pequeñas.

20 Hemos utilizado espectrometría de masas para identificar péptidos generados por electroforesis en gel y digestión triptica de proteínas de membrana extraídas de muestras de tejido de glioblastoma. Las secuencias de péptidos se compararon con bases de datos de proteínas y ADNc existentes y se identificaron las secuencias de genes correspondientes. La proteína de la descripción no ha sido reportada previamente como originada a partir de glioblastoma o membranas de células de cáncer de pulmón y representa una proteína de nuevo valor diagnóstico y terapéutico.

25 Se describen aquí métodos para el diagnóstico de glioblastoma que comprende analizar una muestra de tejido de glioblastoma, por ejemplo, mediante electroforesis en gel u otra técnica apropiada de separación de proteínas para detectar la proteína de la descripción. Estos métodos son también adecuados para el cribado, pronóstico, seguimiento de los resultados de la terapia, el desarrollo de fármacos y el descubrimiento de nuevos objetivos para el tratamiento farmacológico.

Un primer aspecto de la invención proporciona un anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno capaz de unión específica a IGSF4, para uso en el tratamiento o prevención de cáncer de pulmón de células pequeñas, en donde dicho reactivo de afinidad está conjugado con una fracción terapéutica.

30 También se describen métodos de cribado para compuestos que modulan (por ejemplo, sobrerregulan o subregulan) la expresión o actividad biológica de la proteína de la descripción.

También se describen anticuerpos monoclonales. También se describen anticuerpos policlonales u otros reactivos de afinidad tales como Aficuerpos, Nanocuerpos o Unicuerpos capaces de unión inmuno-específica a la proteína descrita en la presente memoria.

35 También se describe un método para cribar y/o diagnosticar glioblastoma en un sujeto humano, método que comprende la etapa de identificar la presencia o ausencia de la proteína de la descripción, en una muestra biológica obtenida a partir de dicho sujeto humano.

40 Se describe adicionalmente un método para hacer seguimiento y/o evaluar el tratamiento del glioblastoma en un sujeto humano, que comprende la etapa de identificar la presencia o ausencia de la proteína de la descripción, en una muestra biológica obtenida a partir de dicho sujeto humano.

También se describe un método para identificar la presencia o ausencia de CHC metastásicas o células de cáncer de pulmón en una muestra biológica obtenida de un sujeto humano, que comprende la etapa de identificar la presencia o ausencia de la proteína de la descripción.

45 Se describe adicionalmente un método para hacer seguimiento y/o evaluar el tratamiento del glioblastoma en un sujeto humano, que comprende la etapa de determinar si la proteína de la descripción se aumenta/disminuye en una muestra biológica obtenida de un paciente.

50 Como se describe en la solicitud, la muestra biológica utilizada puede ser de cualquier fuente tal como una muestra de suero o una muestra de tejido, por ejemplo, hígado, glioblastoma o tejido pulmonar. Por ejemplo, cuando se busca evidencia de CHC metastásico o cáncer de pulmón, se examinarán los sitios principales de CHC o metastásicas de cáncer de pulmón, por ejemplo, los pulmones y huesos para CHC y el cerebro, el hígado, los huesos y las glándulas suprarrenales para el cáncer de pulmón.

Otros aspectos de la presente invención se exponen a continuación y en las reivindicaciones de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra las secuencias de aminoácidos de las dos isoformas de la proteína de la descripción. Los trípticos detectados experimentalmente por espectrometría de masas se destacan - los péptidos de fósforos de masa se muestran en negrita, los péptidos en tándem están subrayados.

5 La Figura 2 muestra el índice de proteína para la proteína de la descripción.

La Figura 3 muestra los datos cuantitativos de la reacción en cadena de polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR) para la proteína de la descripción.

La Figura 4 muestra la secuencia de la proteína de la descripción usada para la inmunización (esto incluye una secuencia señal sintética para la secreción).

10 La Figura 5 muestra los datos de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) para anticuerpos de la proteína de la descripción en la línea celular de cáncer de pulmón NCI-H69.

Descripción detallada de la invención

15 A continuación, se describen detalladamente métodos y composiciones para la detección, diagnóstico y pronóstico clínicos de glioblastoma en un sujeto mamífero, para hacer seguimiento de los resultados de la terapia del glioblastoma. La invención también abarca la administración de composiciones terapéuticas a un sujeto mamífero para tratar o prevenir el cáncer de pulmón. El sujeto mamífero puede ser un mamífero no humano, pero es preferiblemente humano, más preferiblemente un adulto humano, es decir un sujeto humano de al menos 21 (más preferiblemente al menos 35, al menos 50, al menos 60, al menos 70 o al menos 80) años de edad. Para mayor claridad en la descripción, y no a modo de limitación, la descripción que aquí se hará será con respecto al análisis de hígado, glioblastoma y tejido pulmonar. Sin embargo, como apreciarán los expertos en la técnica, los ensayos y técnicas descritos a continuación pueden aplicarse a otros tipos de muestras de pacientes, incluyendo fluidos corporales (por ejemplo, sangre, orina o saliva), una muestra de tejido de un paciente en riesgo de tener CHC, glioblastoma y cáncer de pulmón (por ejemplo, una biopsia tal como una biopsia de hígado, cerebro o pulmón) o un homogeneizado de los mismos. Los métodos y composiciones de la presente descripción son especialmente adecuados para detección, diagnóstico y pronóstico de un sujeto vivo, pero también puede ser usado para diagnóstico postmortem en un sujeto, por ejemplo, para identificar miembros de la familia en riesgo de desarrollar la misma enfermedad.

OGTA025

30 En un ejemplo, se usa electroforesis unidimensional para analizar muestras de tejido de glioblastoma de un sujeto, preferiblemente un sujeto vivo, con el fin de medir la expresión de la proteína de la descripción para detección o diagnóstico del glioblastoma, para determinar el pronóstico de un paciente con glioblastoma, para hacer seguimiento a la efectividad de la terapia del glioblastoma o para el desarrollo de un fármaco.

35 Tal como se usa en la presente memoria, el término "proteína de la descripción", o "OGTA025", se refiere a la proteína ilustrada en la Figura 1 en todas sus isoformas, en particular en sus dos isoformas diferentes detectadas experimentalmente mediante electroforesis unidimensional de hígado y de muestras de tejido de glioblastoma (OGTA025a (SEQ ID NO: 1) y OGTA025b (SEQ ID NO: 2)). Los derivados de proteína de estas secuencias también pueden ser útiles para los mismos propósitos que se describen en la presente memoria.

40 Esta proteína ha sido identificada en extractos de proteína de membrana de muestras de tejido de hígado y de glioblastoma de pacientes con CHC y glioblastoma, a través de los métodos y aparatos de la tecnología preferida (electroforesis en gel unidimensional y digestión trípica de extractos de proteína de membrana). Las secuencias peptídicas se compararon con las bases de datos SWISS-PROT y trEMBL (mantenidas por el Instituto Suizo de Bioinformática (SIB) y el Instituto Europeo de Bioinformática (EBI), que están disponibles en www.expasy.com), y se identificaron las siguientes entradas: Q8N2F4 y Q9BY67. Las secuencias de péptidos también se compararon con la base de datos Ensembl (un proyecto conjunto entre EMBL- EBI y el Instituto Sanger, disponible en www.ensembl.org) y se identificó la siguiente entrada: ENSG00000182985, IGSF4.

45 De acuerdo con SWISS-PROT, IGSF4 es una glicoproteína de membrana con un dominio extracelular homólogo a aquellos de las proteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Puede actuar como un antígeno tumoral reconocido por células T, NK o CD8+; activa las respuestas de las células T NK y CD8+ a través de la molécula asociada a células T restringido al receptor clase I de la superficie celular CRTAM (un receptor principalmente expresado en linfocitos citotóxicos activados). Cuando está presente en células presentadoras de antígeno, regula la expresión de IL-22 mediante células T CD8+ activadas. El par molecular IGSF4/CRTAM podría regular un gran panel de interacciones célula/célula tanto dentro como fuera del sistema inmunológico.

50 También se indica que OGTA025 se expresa en cáncer de pulmón. Los resultados de la reacción en cadena de la polimerasa de la transcriptasa inversa cuantitativa (RT-PCR) (véase el Ejemplo 2 y la Figura 3) mostraron alta expresión de ARNm de OGTA025 en cáncer de pulmón, particularmente cáncer de pulmón de células pequeñas. La expresión de ARNm es una indicación de la expresión de la proteína OGTA025. El análisis de clasificación de células activadas por

fluorescencia (FACS) (véase el Ejemplo 5 y la Figura 5) indicó que una serie de anticuerpos de OGTA025 generados en el Ejemplo 3 se unen bien a células de cáncer de pulmón NCI-H69. Los experimentos de inmunohistoquímica (véase el Ejemplo 6), también mostraron tinción fuerte en una gran mayoría de células tumorales en muestras de cáncer de pulmón de células pequeñas, 5/7.

5 La proteína de la descripción es útil ya que son fragmentos, por ejemplo, fragmentos antigénicos o inmunogénicos de los mismos y derivados de los mismos. Los fragmentos antigénicos o inmunogénicos tendrán típicamente una longitud de 12 aminoácidos o más, por ejemplo, 20 aminoácidos o más, por ejemplo, 50 aminoácidos o más, por ejemplo, 100 aminoácidos o más. Los fragmentos pueden ser 10% o más de la longitud de la proteína completa, por ejemplo, 25% o más, por ejemplo, 50% o 75% o 90% o 95% o más de la longitud de la proteína completa.

10 Los fragmentos antigénicos o inmunogénicos serán capaces de provocar una respuesta inmune relevante en un paciente. El ADN que codifica la proteína de la descripción es también útil, al igual que los fragmentos de la misma, por ejemplo, ADN que codifica fragmentos de la proteína de la descripción tales como fragmentos inmunogénicos de la misma. Los fragmentos de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) que codifican la proteína de la descripción pueden ser 10% o más de la longitud de la región codificante completa, por ejemplo, 25% o más, por ejemplo, 50% o 75% o 90% o 95% o más de la longitud de la región de codificación completa. Los fragmentos de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) pueden ser de 36 nucleótidos o más, por ejemplo, 60 nucleótidos o más, por ejemplo, 150 o 300 nucleótidos o más de longitud.

15 Los derivados de la proteína de la descripción incluyen variantes en la secuencia en la que se han realizado una o más (por ejemplo, 1-20 tal como 15 aminoácidos, o hasta 20% tal como hasta 10%, 5% o 1% en número de aminoácidos con base en la longitud total de la proteína) supresiones, inserciones o sustituciones. Las sustituciones pueden ser típicamente sustituciones conservadoras. Por ejemplo, los derivados pueden tener identidad de secuencia del 80% o más, por ejemplo, 90% o más, por ejemplo, 0,95% o más en comparación con la secuencia de referencia sobre toda la longitud de la secuencia de referencia. Los derivados tendrán típicamente esencialmente la misma función biológica que la proteína de la cual se derivan. Los derivados serán típicamente antigénicos o inmunogénicos comparativamente con la proteína de la que se derivan.

20 Las Tablas 1a, 1b y 1c a continuación ilustran las diferentes apariciones de OGTA025 detectadas mediante electroforesis en gel unidimensional y espectrometría de masas de extractos de proteínas de membrana de muestras de tejido de hígado, glioblastoma y cáncer de pulmón procedentes de pacientes con CHC, glioblastoma y cáncer de pulmón respectivamente. La primera columna proporciona el peso molecular, la segunda columna proporciona la información sobre el protocolo de subfraccionamiento utilizado, si lo hay (véase el Ejemplo 1 más adelante), y la última columna proporciona una lista de las secuencias observadas por espectrometría de masas y las correspondientes SEQ ID Nos.

25 La Tabla 2 a continuación ilustra las diferentes apariciones de OGTA025 detectadas por iTRAQ y espectrometría de masas de extractos de proteínas de membrana de muestras de tejido pulmonar de pacientes con cáncer de pulmón. La primera columna proporciona el número de muestra, la segunda columna proporciona información sobre el número de experimento de iTRAQ para esa muestra y la última columna proporciona una lista de las secuencias observadas por espectrometría de masas y las correspondientes SEQ ID Nos.

Tabla 1a - CHC

PM (Da)	Subfraccionamiento	Tripticos identificados [SEQ ID No]
68904		DFRPLK [6], QTIFYR [8], SDDSVIQLLNPNR [9]
88086	MonoQ Acuoso	AGEEGSIR [4], CEASNIVGK [5], DFRPLK [6], QTIFYR [8], SDDSVIQLLNPNR [9]

40 Tabla 1b - Glioblastoma

PM (Da)	Subfraccionamiento	Tripticos identificados [SEQ ID No]
75255		CEASNIVGK [5], GTYFTHEAK [7], QTIFYR [8], SDDSVIQLLNPNR [9]
89534		QTIFYR [8], SDDSVIQLLNPNR [9]

Tabla 1c - Cáncer de pulmón

PM (Da)	Subfraccionamiento	Tripticos identificados [SEQ ID No]
72723		DVTVIEGEVATISCQVNK [11], EDDGVPVICQVEHPAVTGNLQTQR [12], EGDALILTCEAIGK [13], GTYFTHEAK [7], PQPVMVTWVR [19],

		PQVHIQMTYPLQGLTR [20], QTIYFR [8], SDDSVIQLLNPNR [9], TDNGTYR [21], YLEVQYK [24]
--	--	--

(continuación)

PM (Da)	Subfraccionamiento	Tripticos identificados [SEQ ID No]
85000		DTAVEGEEIEVNCTAMASK [10], DVTVIEGEVATISCQVNK [11], EGDALLETCEAIGK [13], FQLLNFSSELK [14], LLLLLFSAALIPTGDGQNLFTK [16], MASVVLPSGSQCAAAAAAPPGLR [17], NLMIDIQR [18], PQPVMVTWVR [19], PQVHIQMTYPLQGLTR [20], SDDSVIQLLNPNR [9], YFCQLYDPPQESYTTITVLVPPR [23]

Tabla 2 - Cáncer de pulmón iTRAQ

Muestra No.	Experimento No.	Tripticos identificados [SEQ ID No]
Muestra 1	Experimento 1	AGEEGSIR [4],

5 Para OGTA025, el nivel detectado obtenido tras analizar el tejido de sujetos que tienen CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón en relación con el nivel detectado obtenido tras analizar el tejido de sujetos libres de CHC, glioblastoma y cáncer de pulmón dependerá del protocolo analítico particular y de la técnica de detección que se utilice. En consecuencia, la divulgación contempla que cada laboratorio establecerá un intervalo de referencia en sujetos libres de CHC, glioblastoma y cáncer de pulmón de acuerdo con el protocolo analítico y la técnica de detección en uso, como es convencional en la técnica de diagnóstico. Preferiblemente, al menos una muestra de tejido positivo de control de un sujeto que se sabe tiene CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón o al menos una muestra de tejido negativo de control de un sujeto que se sabe está libre de CHC, glioblastoma y cáncer de pulmón (y más preferiblemente tanto muestras de control positivas como negativas) se incluyen en cada lote de muestras de ensayo analizadas.

15 OGTA025 puede usarse para detección, pronóstico, diagnóstico o seguimiento de CHC, glioblastoma y cáncer de pulmón o para desarrollo de fármacos. Como se describe aquí, el tejido de un sujeto (por ejemplo, un sujeto que se sospecha que tiene CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón) se analiza mediante electroforesis unidimensional para detección de OGTA025. Una mayor abundancia de OGTA025 en el tejido del sujeto respecto al tejido de un sujeto o sujetos libres de CHC, glioblastoma y cáncer de pulmón (por ejemplo, una muestra de control) o un intervalo de referencia previamente determinado indica la presencia de CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón.

20 En relación con variantes, fragmentos, fragmentos inmunogénicos o fragmentos antigénicos de OGTA025:

- para aplicaciones de CHC: preferiblemente éstas comprenden una o más de las secuencias identificadas como secuencias trípticas en la tercera columna de la Tabla 1a;
- para aplicaciones de glioblastoma: preferiblemente estas comprenden una o más de las secuencias identificadas como secuencias trípticas en la tercera columna de la Tabla 1b.

25 OGTA025 puede en particular, caracterizarse, como una isoforma que tiene un PM sustancialmente como se indica (por ejemplo, +/- 10%, particularmente +/- 5% del valor) en la columna 1 de cualquiera de las filas de las Tablas 1a o 1b.

30 La descripción proporciona adicionalmente: (a) una preparación que comprende OGTA025 aislado; (b) una preparación que comprende uno o más fragmentos de OGTA025; y (c) anticuerpos u otros reactivos de afinidad tales como Aficuerpos, Nanocuerpos o Unicuerpos que se unen a OGTA025, a dichos fragmentos, o tanto a OGTA025 como a dichos fragmentos. Como se usa en el presente documento, OGTA025 está "aislado" cuando está presente en una preparación que está sustancialmente libre de proteínas contaminantes, es decir, una preparación en la que menos del 10% (preferiblemente menos del 5%, más preferiblemente menos del 1%) de la proteína total presente es o son proteínas contaminantes. Una proteína contaminante es una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos significativamente diferente a la de OGTA025 aislada, según se determina por análisis espectral de masas. Como se usa en el presente documento, una secuencia "significativamente diferente" es aquella que permite que la proteína contaminante se resuelva a partir de OGTA025 por análisis espectral de masas, realizado de acuerdo con el protocolo de referencia.

40 OGTA025 se puede analizar por cualquier método conocido por los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, la tecnología preferida descrita en la presente memoria, ensayos de quinasas, ensayos enzimáticos, ensayos de unión y otros ensayos funcionales, inmunoensayos y transferencia Western. En un ejemplo, OGTA025 se separa en un gel unidimensional en virtud de su PM y se visualiza por tinción del gel. En un ejemplo, OGTA025 se tiñe con un colorante fluorescente y se obtiene una imagen con un escáner de fluorescencia. Sypro Red (Molecular Probes, Inc., Eugene,

Oregón) es un colorante adecuado para este propósito. Un colorante fluorescente preferido se describe en la solicitud de patente estadounidense No. 09/412.168, presentada el 5 de octubre de 1999.

Alternativamente, se puede detectar OGTA025 en un inmunoensayo. En un ejemplo, se realiza un inmunoensayo poniendo en contacto una muestra de un sujeto a ensayar con un anticuerpo anti-OGTA025 (u otro reactivo de afinidad tal como un Aficuerpo, Nanocuerpo o Unicuerpo) en condiciones tales que se pueda producir unión inespecífica si OGTA025 está presente, y detectar o medir la cantidad de cualquier unión inespecífica por el reactivo de afinidad. Los reactivos de afinidad anti- OGTA025 pueden producirse mediante los métodos y técnicas enseñados aquí.

Se puede detectar OGTA025 en virtud de la detección de un fragmento del mismo, por ejemplo, un fragmento inmunogénico o antigénico del mismo. Los fragmentos pueden tener una longitud de al menos 10, más típicamente al menos 20 aminoácidos, por ejemplo, al menos 50 o 100 aminoácidos, por ejemplo, al menos 200 aminoácidos.

En un ejemplo, la unión del anticuerpo (u otro reactivo de afinidad tal como un Aficuerpo, Nanocuerpo o Unicuerpo) en secciones de tejido puede usarse para detectar la localización aberrante de OGTA025 o un nivel aberrante de OGTA025. En un ejemplo específico, se puede usar un anticuerpo (u otro reactivo de afinidad tal como un Aficuerpo, Nanocuerpo o Unicuerpo) para OGTA025 para analizar un tejido del paciente (por ejemplo, tejido de hígado, glioblastoma o pulmón) por el nivel de OGTA025 donde un nivel aberrante de OGTA025 es indicativo de CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón. Como se usa en el presente documento, un "nivel aberrante" significa un nivel que se incrementa en comparación con el nivel en un sujeto libre de CHC, glioblastoma y cáncer de pulmón o un nivel de referencia.

Se pueden usar cualquier inmunoensayo adecuado, incluyendo, sin limitación, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos usando técnicas tales como transferencias de Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), inmunoensayos tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de precipitación en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A.

Por ejemplo, se puede detectar OGTA025 en una muestra de fluido (por ejemplo, sangre, orina o saliva) por medio de un ensayo tipo sándwich de dos etapas. En la primera etapa, se usa un reactivo de captura (por ejemplo, un anticuerpo anti-OGTA025 u otro reactivo de afinidad tal como un Aficuerpo, Nanocuerpo o Unicuerpo) para capturar OGTA025. El reactivo de captura puede ser opcionalmente inmovilizado en una fase sólida. En la segunda etapa, se utiliza un reactivo de detección marcado directa o indirectamente para detectar OGTA025 capturada. En un ejemplo, el reactivo de detección es una lectina. Se puede utilizar cualquier lectina para este propósito que se une preferencialmente a OGTA025 en lugar de a otras isoformas que tienen la misma proteína de núcleo que OGTA025 o a otras proteínas que comparten el determinante antigénico reconocido por el reactivo de afinidad. En un ejemplo preferido, la lectina elegida se une a OGTA025 con una afinidad al menos 2 veces mayor, más preferiblemente al menos una afinidad 5 veces mayor, todavía más preferiblemente al menos una afinidad 10 veces mayor, que a dichas otras isoformas que tienen la misma proteína nuclear que OGTA025 o a dichas otras proteínas que comparten el determinante antigénico reconocido por el reactivo de afinidad. Basándose en la presente descripción, una lectina que es adecuada para detectar OGTA025 puede identificarse fácilmente por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, tras la prueba de una o más lectinas enumeradas en la Tabla I en las páginas 158-159 de Sumar et al., Lectins as Indicators of Disease-Associated Glycoforms, En: Gabius H-J & Gabius S (eds.), 1993, Lectins and Glycobiology, en las páginas 158-174. En un ejemplo alternativo, el reactivo de detección es un anticuerpo (u otro reactivo de afinidad tal como un Aficuerpo, Nanocuerpo o Unicuerpo), por ejemplo, un anticuerpo que detecta inespecíficamente otras modificaciones postraduccionales, tales como un anticuerpo que se une inespecíficamente a aminoácidos fosforilados. Los ejemplos de tales anticuerpos incluyen los que se unen a fosfotirosina (BD Transduction Laboratories, números de catálogo: P11230-050/P11230-150, P11120, P38820, P39020), aquellos que se unen a fosfoserina (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA, Número de catálogo 61-8100) y aquellos que se unen a fosfotreonina (Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA, números de catálogo 71-8200, 13-9002).

Si se desea, también se pueden usar en ensayos de hibridación un gen que codifica OGTA025, un gen relacionado, o secuencias o subsecuencias de ácido nucleico relacionadas, incluyendo secuencias complementarias. Como sonda de hibridación se puede utilizar un nucleótido que codifica OGTA025, o subsecuencias del mismo que comprende al menos 8 nucleótidos, preferiblemente al menos 12 nucleótidos y lo más preferible al menos 15 nucleótidos. Los ensayos de hibridación se pueden utilizar para detección, pronóstico, diagnóstico o seguimiento de las condiciones, trastornos o estados patológicos, asociados con la expresión aberrante del gen que codifica OGTA025, o para diagnóstico diferencial de sujetos con signos o síntomas sugestivos de CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón. En particular, dicho ensayo de hibridación puede llevarse a cabo mediante un método que comprende poner en contacto la muestra de un sujeto que contiene ácido nucleico con una sonda de ácido nucleico capaz de hibridar con un ADN o ARN que codifica OGTA025, en condiciones tales que pueda producirse hibridación y detectar o medir cualquier hibridación resultante.

La descripción también proporciona kits de diagnóstico, que comprenden un anticuerpo anti-OGTA025 (u otro reactivo de afinidad tal como un Aficuerpo, Nanocuerpo o Unicuerpo). Además, dicho kit puede comprender opcionalmente uno o más de los siguientes: (1) instrucciones para usar el reactivo de afinidad anti-OGTA025 para diagnóstico, pronóstico, seguimiento terapéutico o cualquier combinación de estas aplicaciones; (2) un compañero de unión marcado con el

reactivo de afinidad; (3) una fase sólida (tal como una tira reactiva) sobre la que se inmoviliza el reactivo de afinidad anti-OGTA025; y (4) una etiqueta o inserto que indique la aprobación reguladora para el diagnóstico, pronóstico o uso terapéutico o cualquier combinación de los mismos. Si no se proporciona ningún compañero de unión marcado al reactivo de afinidad, el reactivo de afinidad mismo anti-OGTA025 puede marcarse con un marcador detectable, por ejemplo, una fracción quimioluminiscente, enzimática, fluorescente o radioactiva.

La descripción también proporciona un kit que comprende una sonda de ácido nucleico capaz de hibridarse con ARN que codifica OGTA025. En un ejemplo específico, un kit comprende en uno o más recipientes un par de cebadores (por ejemplo, cada uno en el intervalo de tamaños de 6-30 nucleótidos, más preferiblemente 10-30 nucleótidos y aún más preferiblemente 10-20 nucleótidos) que bajo condiciones de reacción apropiadas pueden cebar la amplificación de al menos una porción de un ácido nucleico que codifica OGTA025, tal como mediante la reacción en cadena de la cadena de la ligasa (véase el documento EP 320.308), uso de Q β replicasa, reacción de sonda cíclica, u otros métodos conocidos en la técnica.

Un kit puede opcionalmente comprender adicionalmente una cantidad predeterminada de OGTA025 o un ácido nucleico que codifica OGTA025, por ejemplo, para uso como un estándar o control.

15 Uso en estudios clínicos

Los métodos y composiciones de diagnóstico de la presente descripción pueden ayudar a hacer seguimiento de un estudio clínico, por ejemplo, para evaluar fármacos para terapia de CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón. En un ejemplo, se ensayan las moléculas candidatas para determinar su capacidad para restaurar los niveles de OGTA025 en un sujeto que tiene CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón a niveles encontrados en sujetos libres de CHC, glioblastoma y cáncer de pulmón o, en un sujeto tratado, para preservar los niveles de OGTA025 en o cerca de valores no relacionados con el CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón.

En otro ejemplo, los métodos y composiciones de la presente descripción se usan para seleccionar candidatos para un estudio clínico para identificar individuos que tienen CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón; tales individuos pueden entonces ser excluidos del estudio o pueden ser colocados en una cohorte separada para el tratamiento o el análisis.

25 Producción de proteína de la descripción y el correspondiente ácido nucleico

Un ADN de la presente descripción puede obtenerse por aislamiento como un fragmento de ADNc a partir de bibliotecas de ADNc que utilizan como materiales de partida ARNm comerciales y determinando e identificando las secuencias de nucleótidos de los mismos. Es decir, específicamente, los clones se aíslan aleatoriamente de las bibliotecas de ADNc, que se preparan de acuerdo con el método de Ohara y colaboradores (DNA Research Vol. 4, 53-59 (1997)). A continuación, a través de hibridación, se retiran los clones duplicados (que aparecen repetidamente) y luego se lleva a cabo la transcripción y traducción *in vitro*. Se determinan las secuencias de nucleótidos de ambos terminales de los clones, para los cuales se confirman productos de 50 kDa o más. Además, se buscan las bases de datos de genes conocidos homología usando las secuencias de nucleótidos terminales así obtenidas como consultas. Se determina como resultado la secuencia completa de nucleótidos de un clon revelado como novedoso. Además del método de selección anterior, las secuencias terminales 5' y 3' de ADNc están relacionadas con una secuencia de genoma humano. A continuación, se confirma un gen desconocido de cadena larga en una región entre las secuencias, y se analiza la longitud completa del ADNc. De esta manera, un gen desconocido que no puede obtenerse mediante un método de clonación convencional que depende de genes conocidos puede ser clonado sistemáticamente.

Además, todas las regiones de un gen derivado de un ser humano que contiene un ADN de la presente descripción también pueden prepararse usando un método de PCR tal como RACE mientras se presta suficiente atención para evitar que se produzcan errores artificiales en fragmentos cortos o secuencias obtenidas. Como se ha descrito anteriormente, se pueden obtener clones que tienen ADN de la presente descripción.

En otro medio para clonar ADN de la presente descripción, se produce un cebador de ADN sintético que tiene una secuencia de nucleótidos apropiada de una porción de un polipéptido de la presente descripción, seguido por amplificación por el método de PCR usando una biblioteca apropiada. Alternativamente, la selección puede llevarse a cabo por hibridación del ADN de la presente descripción con un ADN que se ha incorporado en un vector apropiado y se ha marcado con un fragmento de ADN o un ADN sintético que codifica algunas o todas las regiones del polipéptido de la presente divulgación. La hibridación puede llevarse a cabo, por ejemplo, por el método descrito en Current Protocols in Molecular Biology (editado por Frederick M. Ausubel et al., 1987). El ADN de la presente descripción puede ser cualquier ADN, siempre que contenga secuencias de nucleótidos que codifiquen los polipéptidos de la presente descripción como se ha descrito anteriormente. Dicho ADN puede ser un ADNc identificado y aislado a partir de bibliotecas de ADNc o similares que se derivan de hígado, glioblastoma o tejido pulmonar. Dicho ADN puede ser también un ADN sintético o similar. Los vectores para uso en la construcción de la biblioteca pueden ser cualquiera de bacteriófagos, plásmidos, cósmidos, fagémidos o similares. Además, mediante la utilización de una fracción de ARN total o de una fracción de ARNm preparada a partir de las células y/o tejidos anteriores, la amplificación puede llevarse a cabo mediante una reacción en cadena de polimerasa acoplada a transcripción inversa directa (abreviada en lo sucesivo como "método de RT-PCR").

El ADN que codifica el polipéptido anterior que consiste en una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de OGTA025 o al ADN que codifica el polipéptido anterior que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de OGTA025 por supresión, sustitución, o adición de uno o más aminoácidos que componen una porción de la secuencia de aminoácidos pueden producirse fácilmente mediante una combinación apropiada de, por ejemplo, un método de mutagénesis dirigida al sitio, un método de recombinación homóloga de genes, un método de alargamiento de cebadores y el método de PCR conocido por los expertos en la técnica. Además, en este momento, un posible método para hacer que un polipéptido tenga actividad biológica sustancialmente equivalente es la sustitución de aminoácidos homólogos (por ejemplo, aminoácidos polares y no polares, aminoácidos hidrófobos e hidrofílicos, aminoácidos cargados positivamente y negativamente, y aminoácidos aromáticos) entre los aminoácidos que componen el polipéptido. Además, para mantener una actividad biológica sustancialmente equivalente, los aminoácidos dentro de los dominios funcionales contenidos en el polipéptido de la presente descripción se conservan preferiblemente.

Además, los ejemplos de ADN de la presente descripción incluyen ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de OGTA025 y ADN que hibrida en condiciones rigurosas al ADN y que codifica un polipéptido (proteína) que tiene actividad biológica (función) equivalente a la función del polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de OGTA025. En tales condiciones, un ejemplo de dicho ADN capaz de hibridarse con ADN que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de OGTA025 es ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene un grado de homología media global con toda la secuencia de nucleótidos del ADN, tal como aproximadamente del 80% o más, preferiblemente aproximadamente del 90% o más, y más preferiblemente aproximadamente del 95% o más. La hibridación puede llevarse a cabo de acuerdo con un método conocido en la técnica tal como un método descrito en *Current Protocols in Molecular Biology* (editado por Frederick M. Ausubel et al., 1987) o un método de acuerdo con el mismo. En este caso, "condiciones rigurosas" son, por ejemplo, condiciones de aproximadamente "1 x SSC, SDS al 0,1% y 37°C", condiciones más rigurosas de aproximadamente "0,5 x SSC, SDS al 0,1% y 42°C" o incluso condiciones más rigurosas de aproximadamente "0,2 x SSC, SDS al 0,1% y 65°C". Con condiciones de hibridación más rigurosas, puede esperarse el aislamiento de un ADN que tiene una alta homología con una secuencia de sonda. Las combinaciones anteriores de SSC, SDS y las condiciones de temperatura se presentan con fines ilustrativos. Una rigurosidad similar a la anterior puede ser lograda por personas capacitadas en la técnica usando una combinación apropiada de los factores anteriores u otros factores (por ejemplo, la concentración de la sonda, la longitud de la sonda y el tiempo de reacción para la hibridación) para la determinación de la rigurosidad de hibridación.

Un ADN clonado de la presente descripción puede ser utilizado directamente, o, si se desea, usado después de la digestión con una enzima de restricción o adición de un enlazador, dependiendo de los propósitos. El ADN puede tener ATG como codón de inicio de la traducción en el lado del terminal 5' y tener TAA, TGA o TAG como codón de terminación de la traducción en el lado del terminal 3'. Estos codones de inicio y terminación de la traducción también se pueden añadir usando un adaptador apropiado de ADN sintético.

Cuando se proporciona para uso con los métodos de la divulgación, el OGTA025 se proporciona preferiblemente en forma aislada. Más preferiblemente, el polipéptido OGTA025 ha sido purificado al menos en cierta medida. El polipéptido OGTA025 puede proporcionarse en forma sustancialmente pura, es decir libre, hasta un grado sustancial, de otras proteínas. El polipéptido OGTA025 también se puede producir usando métodos recombinantes, producido sintéticamente o producido por una combinación de estos métodos. OGTA025 puede prepararse fácilmente por cualquier método conocido por los expertos en la técnica, que implica producir un vector de expresión que contiene un ADN de la presente descripción o un gen que contiene un ADN de la presente descripción, cultivar un transformante transformado usando el vector de expresión, generando y acumulando un polipéptido de la presente descripción o una proteína recombinante que contiene el polipéptido y, a continuación, recoger el producto resultante.

El polipéptido recombinante OGTA025 puede prepararse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica a partir de células huésped manipuladas genéticamente que comprenden sistemas de expresión. Por consiguiente, la presente descripción también se refiere a sistemas de expresión que comprenden un polipéptido o ácido nucleico de OGTA025, a células huésped que se manipulan genéticamente con tales sistemas de expresión y a la producción de polipéptido OGTA025 por técnicas recombinantes. Para la producción de polipéptido recombinante OGTA025, las células huésped pueden ser modificadas genéticamente para incorporar sistemas de expresión o porciones de los mismos para ácidos nucleicos. Esta incorporación puede realizarse usando métodos bien conocidos en la técnica, tales como transfección de fosfato de calcio, transfección mediada por DEAD-dextrano, transvección, microinyección, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, carga por raspado, introducción balística o infección. (Véase, por ejemplo, Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology*, 1986 y Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

Como células huésped, por ejemplo, se usan bacterias del género *Escherichia*, *Streptococos*, *Estafilococos*, *Streptomices*, bacterias del género *Bacilos*, levaduras, células de *Aspergillus*, células de insecto, insectos y células animales. Ejemplos específicos de bacterias del género *Escherichia*, que se usan aquí, incluyen *Escherichia coli* K12 y DH1 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 60, 160 (1968)), JM103 (*Nucleic Acids Research*, Vol. 9, 309 (1981)), JA221 (*Journal of Molecular Biology*, Vol. 120, 517 (1978)) y HB101 (*Journal of Molecular Biology*, Vol. 41, 459 (1969)). Como bacterias del género *Bacilos*, por ejemplo, se utilizan *Bacillus subtilis* M114 (*Gene*, Vol. 24, 255 (1983)) y 207-21 (*Journal of Biochemistry*, Vol. 95, 87 (1984)). Como levaduras, por ejemplo, se usan, *Saccharomyces cerevisiae* AH22,

AH22R, NA87-11A, DKD-5D y 20B-12, SchizoSaccharomyces pombe NCYC1913 y NCYC2036 y Pichia pastoris. Como células de insecto, por ejemplo, se utilizan células de Drosophila S2 y Spodoptera Sf9. Como células animales, por ejemplo, se usan células de mono COS-7 y Vero, células CHO de hámster chino (abreviadas en lo sucesivo como células CHO), células CHO deficientes en el gen de dhfr, células L de ratón, células AtT-20 de ratón, células de mieloma de ratón, células GH3 de rata, células FL humanas, células COS, HeLa, C127, 3T3, HEK 293, BHK y células de melanoma de Bowes.

Se pueden emplear también sistemas de traducción libres de células para producir polipéptidos recombinantes (por ejemplo, lisado de reticulocitos de conejo, lisado de germen de trigo, los kits de transducción y transcripción SP6/T7 *in vitro* T&T y RTS 100 E. coli HY de Roche Diagnostics Ltd., Lewes, RU y el Sistema de Transcripción/Traducción acoplado TNT Quick de Promega RU, Southampton, RU).

El vector de expresión puede producirse de acuerdo con un método conocido en la técnica. Por ejemplo, el vector puede producirse mediante (1) corte de un fragmento de ADN que contiene un ADN de la presente descripción o un gen que contiene un ADN de la presente descripción y (2) ligación del fragmento de ADN secuencia abajo del promotor en un vector de expresión apropiado. Se puede utilizar una amplia variedad de sistemas de expresión, tales como, y sin limitación, sistemas cromosómicos, episomales y derivados de virus, por ejemplo, plásmidos derivados de Escherichia coli (por ejemplo, pBR322, pBR325, pUC18 y pUC118), plásmidos derivados de Bacillus subtilis (por ejemplo, pUB110, y pTP5 y pC194), de bacteriófagos, de transposones, de episomas de levadura (por ejemplo, pSH19 y pSH15), de elementos de inserción, de elementos cromosómicos de levadura, de virus tales como baculovirus, papovirus tales como SV40, virus vacuna, adenovirus, virus de la viruela aviar, virus de la pseudorrabia y retrovirus, y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como aquellos derivados de los elementos genéticos de plásmidos y bacteriófagos (tales como fago lambda), tales como cósmidos y fagémidos. Los sistemas de expresión pueden contener regiones de control que regulan, así como engendran expresión. Los promotores que se utilizarán en la presente descripción pueden ser cualquier promotor siempre y cuando sean apropiados para que los huéspedes sean utilizados para la expresión génica. Por ejemplo, cuando un huésped es Escherichia coli, se prefiere un promotor trp, un promotor lac, un promotor recA, un promotor pL, un promotor lpp y similares. Cuando un huésped es Bacillus subtilis, se prefiere un promotor SPO1, un promotor SPO2, un promotor penP y similares. Cuando un huésped es levadura, se prefiere un promotor PHO5, un promotor PGK, un promotor GAP, un promotor ADH y similares. Cuando se utiliza una célula animal como huésped, los ejemplos de promotores para uso en este caso incluyen un promotor SRa, un promotor SV40, un promotor LTR, un promotor CMV y un promotor HSV-TK. Generalmente, puede usarse cualquier sistema o vector que sea capaz de mantener, propagar o expresar un ácido nucleico para producir un polipéptido en un huésped.

La secuencia de ácido nucleico apropiada puede insertarse en un sistema de expresión mediante cualquier variedad de técnicas bien conocidas y de rutina, tales como las expuestas en Sambrook et al., citado más arriba. Se pueden incorporar señales de secreción apropiadas en el polipéptido OGTA025 para permitir la secreción de la proteína traducida en el lumen del retículo endoplásmico, el espacio periplasmático o el entorno extracelular. Estas señales pueden ser endógenas al polipéptido OGTA025 o pueden ser señales heterólogas. La transformación de las células huésped puede llevarse a cabo de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede hacer referencia a los siguientes documentos: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 69, 2110 (1972); Gene, Vol. 17, 107 (1982); Molecular & General Genetics, Vol. 168, 111 (1979); Methods in Enzymology, Vol. 194, 182 - 187 (1991); Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), Vol. 75, 1929 (1978); Cell Technology, volumen separado 8, New Cell Technology, Experimental Protocol. 263- 267 (1995) (publicado por Shujunsha); y Virology, vol. 52, 456 (1973). El transformante así obtenido transformado con un vector de expresión que contiene un ADN de la presente descripción o un gen que contiene un ADN de la presente descripción pueden cultivarse de acuerdo con un método conocido en la técnica. Por ejemplo, cuando los huéspedes son bacterias del género Escherichia, las bacterias se cultivan generalmente entre aproximadamente 15°C y 43°C durante aproximadamente 3 a 24 horas. Si es necesario, también se puede añadir aireación o agitación. Cuando los huéspedes son bacterias del género Bacillus, las bacterias se cultivan generalmente entre aproximadamente 30°C y 40°C durante aproximadamente 6 a 24 horas. Si es necesario, también se puede añadir aireación o agitación. Cuando se cultivan los transformantes cuyos huéspedes son levaduras, el cultivo se lleva a cabo generalmente aproximadamente entre 20°C y 35°C durante aproximadamente 24 a 72 horas usando medios con pH ajustado entre aproximadamente 5 y 8. Si es necesario, también se puede añadir aireación o agitación. Cuando se cultivan transformantes cuyos huéspedes son células animales, las células se cultivan generalmente aproximadamente entre 30°C y 40°C durante aproximadamente 15 a 60 horas usando medios con el pH ajustado que esta aproximadamente entre 6 y 8. Si es necesario, también se puede añadir aireación o agitación.

Si se va a expresar un polipéptido OGTA025 para uso en ensayos de selección con base en células, se prefiere que el polipéptido se produzca en la superficie celular. En este caso, las células pueden recogerse antes de su uso en el ensayo de selección. Si el polipéptido OGTA025 se secreta en el medio, el medio puede ser recuperado con el fin de aislar dicho polipéptido. Si se producen intracelularmente, las células deben ser lisadas antes de que se recupere el polipéptido OGTA025.

El polipéptido OGTA025 puede recuperarse y purificarse a partir de cultivos de células recombinantes o de otras fuentes biológicas mediante métodos bien conocidos, incluyendo precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de hidroxipatita, cromatografía de tamizado molecular, métodos de centrifugación, métodos de electroforesis y cromatografía de lectina. En un ejemplo, se utiliza una combinación de

estos métodos. En otro ejemplo, se utiliza cromatografía líquida de alto rendimiento. En un ejemplo adicional, se puede usar un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido OGTA025 para agotar una muestra que comprende un polipéptido OGTA025 de dicho polipéptido o para purificar dicho polipéptido.

5 Para separar y purificar un polipéptido o una proteína de la presente descripción a partir de los productos de cultivo, por ejemplo, después del cultivo, los cuerpos microbianos o células se recogen mediante un método conocido, se suspenden en un regulador apropiado, los cuerpos microbianos o las células se rompen, por ejemplo, mediante ondas ultrasónicas, lisozimas, y/o congelación-descongelación, el resultado se somete a continuación a centrifugación o filtración, y luego se puede obtener un extracto crudo de la proteína. El regulador puede contener también un agente de desnaturalización de proteínas tal como urea o clorhidrato de guanidina o un surfactante tal como Triton X-100® (MR).
 10 Cuando la proteína se secreta en una solución de cultivo, los cuerpos o células microbianas y un sobrenadante se separan por un método conocido después de la terminación del cultivo y después se recoge el sobrenadante. La proteína contenida en el sobrenadante de cultivo así obtenido o el extracto se puede purificar mediante una combinación apropiada de métodos conocidos de separación y purificación. El polipéptido (proteína) así obtenido de la presente descripción se puede convertir en una sal mediante un método conocido o un método según el mismo. Por el
 15 contrario, cuando el polipéptido (proteína) de la presente descripción se obtiene en forma de una sal, puede convertirse en una proteína o péptido libre u otra sal mediante un método conocido o un método según el mismo. Además, se hace actuar una enzima apropiada de modificación de proteínas tal como tripsina o quimotripsina sobre una proteína producida mediante un recombinante antes o después de la purificación, de modo que se puede añadir arbitrariamente la modificación o se puede eliminar parcialmente un polipéptido. La presencia de un polipéptido (proteína) de la
 20 presente descripción o una sal del mismo puede medirse mediante diversos ensayos de unión, inmunoensayos enzimáticos usando anticuerpos específicos, y similares.

Pueden usarse técnicas bien conocidas en la técnica para replegarse hasta regenerar las conformaciones nativas o activas del polipéptido OGTA025 cuando el polipéptido ha sido desnaturalizado durante el aislamiento y/o purificación.
 25 En el contexto de la presente descripción, el polipéptido OGTA025 puede obtenerse a partir de una muestra biológica de cualquier fuente, tal como, y sin limitación, una muestra de sangre o tejido, por ejemplo, una muestra de hígado, glioblastoma o tejido pulmonar.

El polipéptido OGTA025 puede estar en forma de una "proteína madura" o puede ser parte de una proteína mayor tal como una proteína de fusión. A menudo es ventajoso incluir una secuencia de aminoácidos adicional que contiene secuencias secretoras o guía, una secuencia pre, pro o prepro-proteína, o una secuencia que ayuda en la purificación tal como una etiqueta de afinidad, por ejemplo, pero sin limitación, múltiples residuos de histidina, una etiqueta FLAG, una etiqueta HA o una etiqueta myc.
 30

También se puede usar una secuencia adicional que puede proporcionar estabilidad durante la producción recombinante. Dichas secuencias pueden eliminarse opcionalmente según se requiera mediante la incorporación de una secuencia escindible como una secuencia adicional o parte de la misma. De este modo, un polipéptido OGTA025 puede fusionarse con otras fracciones que incluyen otros polipéptidos o proteínas (por ejemplo, glutatión S-transferasa y proteína A). Dicha proteína de fusión se puede escindir usando una proteasa apropiada, y luego se separa en cada proteína. Dichas secuencias adicionales y marcadores de afinidad son bien conocidos en la técnica. Además de lo anterior, las características conocidas en la técnica, tales como un potenciador, una señal de empalme, una señal de adición de poliA, un marcador de selección y un origen de replicación de SV40 se pueden añadir a un vector de expresión, si se desea.
 40

Producción de reactivos de afinidad para OGTA025

Según los expertos en la técnica, hay tres tipos principales de reactivos de afinidad: anticuerpos monoclonales, anticuerpos de despliegue en fagos y moléculas pequeñas tales como Aficuerpos, anticuerpos de dominio (dAb), Nanocuerpos o Unicuerpos. En general, en las aplicaciones de acuerdo con la presente descripción, donde se indica el uso de anticuerpos, se pueden emplear otros reactivos de afinidad (por ejemplo, Aficuerpos, anticuerpos de dominio, Nanocuerpos o Unicuerpos).
 45

Producción de anticuerpos para OGTA025

De acuerdo con la descripción OGTA025, un análogo OGTA025, una proteína relacionada con OGTA025 o un fragmento o derivado de cualquiera de los anteriores, se puede usar como un inmunógeno para generar anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a dicho inmunógeno. Tales inmunógenos pueden aislarse por cualquier medio conveniente, incluyendo los métodos descritos anteriormente. El término "anticuerpo" tal como se usa en la presente descripción se refiere a un péptido o polipéptido derivado de, modelado después o codificado sustancialmente por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o fragmentos de los mismos, capaz de unirse específicamente a un antígeno o epítipo. Véase, por ejemplo, Fundamental Immunology, 3ª Edición, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993); Wilson (1994) J. Immunol. Métodos 175: 267- 273; Yarmush (1992) J. Biochem. Biophys. Methods 25: 85- 97. El término anticuerpo incluye porciones de unión al antígeno, es decir, "sitios de unión al antígeno" (por ejemplo, fragmentos, subsecuencias, regiones determinantes de complementariedad (CDR)) que retienen capacidad para unirse al antígeno, incluyendo (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente
 50
 55

5 disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste de los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región aislada de determinación de complementariedad (CDR). Los anticuerpos de cadena única también se incluyen por referencia en el término "anticuerpo". Los anticuerpos para uso en la invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, biespecíficos, humanizados o quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab y fragmentos F(ab')₂, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (Anti-Id), y fragmentos de unión al epítipo de cualquiera de los anteriores. Las moléculas de inmunoglobulina para uso en la invención pueden ser de cualquier clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) o subclase de la molécula de inmunoglobulina.

10 El término "se une específicamente" (o "se une inmunoespecíficamente") no pretende indicar que un anticuerpo se une exclusivamente a su objetivo pretendido. En vez de eso, un anticuerpo "se une específicamente" si su afinidad por su objetivo pretendido es aproximadamente 5 veces mayor cuando se compara con su afinidad por una molécula no objetivo. Preferiblemente, la afinidad del anticuerpo será al menos aproximadamente 5 veces, preferiblemente 10 veces, más preferiblemente 25 veces, incluso más preferiblemente 50 veces, y lo más preferible 100 veces o más, mayor para una molécula objetivo que su afinidad por una molécula no objetivo. En los ejemplos preferidos, la unión específica entre un anticuerpo u otro agente de unión y un antígeno significa una afinidad de unión de al menos 10⁶ M⁻¹. Los anticuerpos preferidos se unen con afinidades de al menos aproximadamente 10⁷ M⁻¹, y preferiblemente entre aproximadamente 10⁸ M⁻¹ hasta aproximadamente 10⁹ M⁻¹, aproximadamente 10⁹ M⁻¹, o aproximadamente 10¹⁰ M⁻¹ hasta aproximadamente 10¹¹ M⁻¹.

20 La afinidad se calcula como $K_d = k_{\text{disociación}}/k_{\text{asociación}}$ ($k_{\text{disociación}}$ es la constante de velocidad de disociación, $k_{\text{asociación}}$ es la constante de velocidad de asociación y K_d es la constante de equilibrio). La afinidad se puede determinar en el equilibrio midiendo la fracción enlazada (r) del ligando marcado a diversas concentraciones (c). Los datos se representan gráficamente utilizando la ecuación de Scatchard:

$$r/c = K(n-r):$$

25 en dónde

r = moles de ligando unido/moles del receptor en equilibrio;

c = concentración del ligando libre en el equilibrio;

K = constante de asociación de equilibrio; y

n = número de sitios de unión al ligando por molécula receptora

30 Mediante análisis gráfico, r/c se grafica en el eje Y frente a r en el eje X, produciendo así un gráfico de Scatchard. La afinidad es la pendiente negativa de la recta. $k_{\text{disociación}}$ se puede determinar mediante competencia del ligando marcado unido con un exceso de ligando no marcado (véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 6.316.409). La afinidad de un agente objetivo por su molécula objetivo es preferiblemente al menos aproximadamente 1x10⁻⁶ moles/litro, es más preferiblemente al menos aproximadamente 1x10⁻⁷ moles/litro, es incluso más preferiblemente al menos aproximadamente 1x10⁻⁸ moles/litro, es aún más preferiblemente al menos aproximadamente 1x10⁻⁹ moles/litro y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 1x10⁻¹⁰ moles/litro. La medición de la afinidad del anticuerpo mediante el análisis de Scatchard es bien conocida en la técnica. Véase, por ejemplo, van Erp et al., J. Immunoassay 12: 425-43, 1991; Nelson y Griswold, Comput. Methods Programs Biomed. 27: 65-8, 1988.

40 En un ejemplo, los anticuerpos que reconocen productos génicos de genes que codifican OGTA025 se encuentran públicamente disponibles. En otro ejemplo, se usan métodos conocidos por los expertos en la técnica para producir anticuerpos que reconocen OGTA025, un análogo de OGTA025, un polipéptido relacionado con OGTA025, o un fragmento o derivado de cualquiera de los anteriores. Un experto en la técnica reconocerá que están disponibles muchos procedimientos para la producción de anticuerpos, por ejemplo, como se describe en Antibodies, A Laboratory Manual, Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), Cold Spring Harbor, N.Y. Un experto en la técnica apreciará también que fragmentos de unión o fragmentos Fab que imitan anticuerpos también se pueden preparar a partir de información genética mediante diversos procedimientos (Antibody Engineering: A Practical Approach (Borrebæck, C., ed.), 1995, Oxford University Press, Oxford, J. Immunol., 149, 3914-3920 (1992)).

45 En un ejemplo, se producen anticuerpos para un dominio específico de OGTA025. En un ejemplo específico, se usan fragmentos hidrofílicos de OGTA025 como inmunógenos para la producción de anticuerpos. En la producción de anticuerpos, la selección del anticuerpo deseado puede realizarse mediante técnicas conocidas en el arte, por ejemplo, ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas). Por ejemplo, para seleccionar anticuerpos que reconocen un dominio específico de OGTA025, se pueden ensayar hibridomas generados para un producto que se une a un fragmento de OGTA025 que contiene dicho dominio. Para la selección de un anticuerpo que se une específicamente a un primer homólogo de OGTA025, pero que no se une específicamente a (o se une menos ávidamente) a un segundo homólogo de OGTA025, se puede seleccionar sobre la base de la unión positiva al primer homólogo de OGTA025 y la falta de unión A (o una unión reducida) al segundo homólogo de OGTA025. De manera similar, para la selección de un anticuerpo que se une específicamente a OGTA025 pero que no se une específicamente (o se une menos ávidamente

a) una isoforma diferente de la misma proteína (tal como una glicofoma diferente que tiene el mismo péptido central que OGTA025), se puede seleccionar sobre la base de la unión positiva a OGTA025 y la falta de unión a (o unión reducida a) la isoforma diferente (por ejemplo, una glicofoma diferente). Por tanto, la presente descripción proporciona un anticuerpo (preferiblemente un anticuerpo monoclonal) que se une con mayor afinidad (preferiblemente al menos 2 veces, más preferiblemente al menos 5 veces, todavía más preferiblemente al menos 10 veces mayor afinidad) a OGTA025 que a una isoforma o isoformas diferentes (por ejemplo, glicofomas) de OGTA025.

Los anticuerpos policlonales que pueden utilizarse en los métodos de la invención son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas de los sueros de animales inmunizados. También se puede usar suero inmune no fraccionado. Pueden usarse diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos policlonales para OGTA025, un fragmento de OGTA025, un polipéptido relacionado con OGTA025, o un fragmento de un polipéptido relacionado con OGTA025. Por ejemplo, una forma es purificar polipéptidos de interés o sintetizar los polipéptidos de interés usando, por ejemplo, métodos de síntesis de péptidos en fase sólida bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Guide to Protein Purification, Murray P. Deutcher, ed., Meth. Enzymol. Vol. 182 (1990); Solid Phase Peptide Synthesis, Greg B. Fields ed., Meth. Enzymol. Vol. 289 (1997); Kiso et al., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 38: 1192-99, 1990; Mostafavi et al., Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids 1: 255-60, 1995; Fujiwara et al., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 44: 1326-31, 1996. Los polipéptidos seleccionados pueden utilizarse luego para inmunizar mediante inyección de diversos animales huésped, incluyendo, pero sin limitarse a, conejos, ratones, ratas, etc., para generar anticuerpos policlonales o monoclonales. La Tecnología preferida descrita en el presente documento proporciona OGTA025 aislado adecuado para dicha inmunización. Si se purifica OGTA025 por electroforesis en gel, se puede utilizar OGTA025 para inmunización con o sin extracción previa del gel de poliacrilamida. Pueden usarse diversos adyuvantes (es decir, inmunoestimulantes) para potenciar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie huésped, incluyendo, pero no limitándose a, adyuvante de Freund completo o incompleto, un gel mineral tal como hidróxido de aluminio, sustancia de superficie activa tal como lisolectina, polioli plurónico, un polianión, un péptido, una emulsión oleosa, una hemocianina de lapa ojo de cerradura, dinitrofenol y un adyuvante tal como BCG (bacilo Calmette-Guerin) o *corinebacterium parvum*. Los adyuvantes adicionales son también bien conocidos en la técnica.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales (mAb) dirigidos hacia OGTA025, un fragmento de OGTA025, un polipéptido relacionado con OGTA025, o un fragmento de un polipéptido relacionado con OGTA025, cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo. Por ejemplo, la técnica del hibridoma desarrollada originalmente por Kohler y Milstein (1975, Nature 256: 495-497), así como la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4: 72), y la técnica de hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., 1985, en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., páginas 77-96). Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas. El hibridoma que produce los mAb para uso en la invención puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*. En un ejemplo adicional, los anticuerpos monoclonales pueden producirse en animales libres de gérmenes utilizando tecnología conocida (PCT/US90/02545).

Los anticuerpos monoclonales incluyen, pero no se limitan a anticuerpos monoclonales humanos y anticuerpos monoclonales quiméricos (por ejemplo, quimeras de humano-ratón). Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, tales como aquellas que tienen una región constante de inmunoglobulina humana y una región variable derivada de un mAb murino. (Véase, por ejemplo, Cabilly et al., patente estadounidense No. 4.816.567; y Boss et al., patente estadounidense NO. 4.816.397. Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos procedentes de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR, por ejemplo), de la especie no humana y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana. (Véase, por ejemplo, Queen, patente estadounidense No. 5.585.089)

Los anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo utilizando métodos descritos en la publicación PCT No. WO 87/02671; la solicitud de patente europea 184.187; la solicitud de patente europea 171.496; la solicitud de patente europea 173.494; la publicación PCT No. WO 86/01533; la patente estadounidense No. 4.816.567; la solicitud de patente europea 125.023; Better et al., 1988, Science 240: 1041-1043; Liu et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443; Liu et al., 1987, J. Immunol. 139: 3521-3526; Sun et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 214-218; Nishimura et al., 1987, Canc. Res. 47: 999-1005; Wood et al., 1985, Nature 314: 446-449; y Shaw et al., 1988, J. Natl. Cancer Inst. 80: 1553-1559; Morrison, 1985, Science 229: 1202-1207; Oi et al., 1986, Bio/Techniques 4: 214; la patente estadounidense No. 5.225.539; Jones et al., 1986, Nature 321: 552-525; Verhoeyan et al. (1988) Science 239: 1534; y Beidler et al., 1988, J. Immunol. 141: 4053-4060.

Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de sujetos humanos. Tales anticuerpos se pueden producir utilizando ratones transgénicos que son incapaces de expresar genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina endógena, pero que pueden expresar genes de cadena pesada y ligera humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan en una forma normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, la totalidad o una parte de OGTA025. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno pueden ser obtenidos usando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos se reorganizan durante la diferenciación de células B, y posteriormente experimentan un cambio de clase y mutación somática. Por lo tanto, utilizando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg

y Huszar (1995, *Int. Rev. Immunol.* 13: 65-93). Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir tales anticuerpos, véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses Nos. 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; y 5.545.806. Además, se pueden emplear compañías tales como Abgenix, Inc. (Freemont, CA) y Genpharm (San José, CA) para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando tecnología similar a la descrita anteriormente.

Se pueden generar anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado usando una técnica denominada "selección guiada". En este enfoque se utiliza un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo (Jespers et al. (1994) *Bio/Technology* 12: 899-903). Los anticuerpos para uso en la presente invención también pueden generarse mediante el uso de la tecnología de despliegue en fagos para producir y explorar bibliotecas de polipéptidos para la unión a un objetivo seleccionado. Véase, por ejemplo, Cwirla et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6378-82, 1990; Devlin et al., *Science* 249, 404-6, 1990, Scott y Smith, *Science* 249, 386-88, 1990; y Ladner et al., patente estadounidense No. 5.571.698. Un concepto básico de los métodos de despliegue en fagos es el establecimiento de una asociación física entre el ADN que codifica un polipéptido que va a ser cribado y el polipéptido. Esta asociación física es proporcionada por la partícula de fago, que muestra un polipéptido como parte de una cápside que encierra el genoma del fago que codifica el polipéptido. El establecimiento de una asociación física entre polipéptidos y su material genético permite la detección masiva simultánea de un número muy grande de fagos que portan diferentes polipéptidos. Los fagos que muestran un polipéptido con afinidad por un objetivo se unen al objetivo y estos fagos se enriquecen por selección de afinidad al objetivo. La identidad de los polipéptidos mostrados a partir de estos fagos se puede determinar a partir de sus genomas respectivos. Usando estos métodos, se puede sintetizar un granel un polipéptido identificado por tener una afinidad de unión por un objetivo deseado por medios convencionales. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 6.057.098. En particular, dichos fagos pueden utilizarse para mostrar dominios de unión a antígenos expresados a partir de un repertorio o biblioteca de anticuerpos combinatorios (por ejemplo, humanos o murinos). El fago que expresa un dominio de unión al antígeno que se une al antígeno de interés puede seleccionarse o identificarse con antígeno, por ejemplo, usando antígeno o antígeno marcado unido o capturado en una superficie sólida o perla. Los fagos utilizados en estos métodos son típicamente fagos filamentosos que incluyen fd y dominios de unión a M13 expresados a partir de fagos con dominios de anticuerpo Fab, Fv o Fv estabilizados con disulfuro fusionados de forma recombinante ya sea con la proteína del gen o del gen VIII del fago. Los métodos de despliegue en fagos que se pueden usar para elaborar los anticuerpos para uso en la presente invención incluyen aquellos descritos en Brinkman et al., *J. Immunol. Methods* 182: 41-50 (1995); Ames et al., *J. Immunol. Methods* 184: 177-186 (1995); Kettleborough et al., *Eur. J. Immunol.* 24: 952-958 (1994); Persic et al., *Gene* 1879-18 (1997); Burton et al., *Advances in Immunology* 57: 191-280 (1994); solicitud PCT No. PCT/GB91/01134; publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y las patentes estadounidenses Nos. 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

Tal como se describe en las referencias anteriores, después de la selección del fago, las regiones que codifican el anticuerpo del fago pueden aislarse y usarse para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión al antígeno deseado, y expresarse en cualquier huésped deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células de plantas, levaduras y bacterias, por ejemplo, como se describe en detalle más adelante. Por ejemplo, también se pueden emplear técnicas para producir de manera recombinante fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ utilizando métodos conocidos en la técnica tales como los descritos en la publicación PCT WO 92/22324; Mullinax et al., *BioTechniques* 12 (6): 864-869 (1992); y Sawai et al., *AJRI* 34: 26-34 (1995); Y Better et al., *Science* 240: 1041-1043 (1988).

Ejemplos de técnicas que se pueden usar para producir Fv y anticuerpos de cadena sencilla incluyen aquellos descritos en las patentes estadounidenses Nos. 4.946.778 y 5.258.498; Huston et al., *Methods in Enzymology* 203: 46-88 (1991); Shu et al., *PNAS* 90: 7995-7999 (1993); y Skerra et al., *Science* 240: 1038-1040 (1988).

La invención proporciona además el uso de anticuerpos biespecíficos, que pueden elaborarse por métodos conocidos en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Milstein et al., 1983, *Nature* 305: 537-539). Debido a la clasificación aleatoria de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas, estos hibridomas (quadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa y los rendimientos del producto son bajos. Procedimientos similares se describen en WO 93/08829, publicada el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker et al., 1991, *EMBO J.* 10: 3655-3659.

De acuerdo con un enfoque diferente y más preferido, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo

huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en ejemplos cuando las relaciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido utilizadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o para las tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las proporciones no son de particular importancia.

En un ejemplo preferido de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones indeseadas de cadenas de inmunoglobulina, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo la mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera fácil de separación. Este enfoque se describe en el documento WO 94/04690 publicado el 3 de marzo de 1994. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 1986, 121: 210.

La invención proporciona el uso de fragmentos funcionalmente activos, derivados o análogos de las moléculas de inmunoglobulina anti-OGTA025. Funcionalmente activo significa que el fragmento, derivado o análogo es capaz de provocar anticuerpos anti-anti-idiotipos (es decir, anticuerpos terciarios) que reconocen el mismo antígeno que es reconocido por el anticuerpo del cual se deriva el fragmento, derivado o análogo. Específicamente, en un ejemplo preferido, se puede mejorar la antigenicidad del idiotipo de la molécula de inmunoglobulina mediante la supresión de las secuencias de marco y la CDR que son C-terminales de la secuencia de la CDR que reconoce específicamente al antígeno. Para determinar qué secuencias de la CDR se unen al antígeno, se pueden usar péptidos sintéticos que contienen las secuencias de la CDR en ensayos de unión con el antígeno por cualquier método de ensayo de unión conocido en la técnica.

La presente invención proporciona el uso de fragmentos de anticuerpos tales como, pero sin limitarse a, fragmentos F(ab')₂ y fragmentos Fab. Los fragmentos de anticuerpo que reconocen epítopos específicos pueden ser generados por técnicas conocidas. Los fragmentos F(ab')₂ consisten en la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada y se generan por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo. Los fragmentos Fab se generan reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. La invención también proporciona el uso de dímeros de cadenas pesadas y cadenas ligeras de los anticuerpos, o cualquier fragmento mínimo de los mismos tales como Fv o anticuerpos de cadena sencilla (SCA) (por ejemplo, como se describe en la patente estadounidense No. 4.946.778; Bird, 1988, *Science* 242: 423-42, Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883 y Ward et al., 1989, *Nature* 334: 544-54), o cualquier otra molécula con la misma especificidad que el anticuerpo para uso en la invención. Los anticuerpos de cadena sencilla se forman uniendo los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv a través de un puente de aminoácidos, dando como resultado un polipéptido de cadena sencilla. Se pueden utilizar técnicas para el montaje de fragmentos Fv funcionales en *E. coli* (Skerra et al., 1988, *Science* 242: 1038-1041).

En otras realizaciones, la invención proporciona el uso de proteínas de fusión de las inmunoglobulinas (o fragmentos funcionalmente activos de las mismas), por ejemplo, en las que la inmunoglobulina se fusiona a través de un enlace covalente (por ejemplo, un enlace peptídico), ya sea en el terminal N o en el terminal C con una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o porción de la misma, preferiblemente al menos una porción de 10, 20 o 50 aminoácidos de la proteína) que no es la inmunoglobulina. Preferiblemente, la inmunoglobulina, o fragmento de la misma, se enlaza covalentemente a la otra proteína en el terminal N del dominio constante. Tal como se ha indicado anteriormente, dichas proteínas de fusión pueden facilitar la purificación, aumentar la semivida *in vivo* y potenciar el suministro de un antígeno a través de una barrera epitelial al sistema inmunológico.

Las inmunoglobulinas para uso en la invención incluyen análogos y derivados que son modificados, es decir, por la unión covalente de cualquier tipo de molécula, siempre y cuando dicha unión covalente no perjudique la unión inmuno-específica. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados y análogos de las inmunoglobulinas incluyen aquellas que han sido modificados adicionalmente, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosfilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero sin limitarse a, escisión química específica, acetilación, formilación, etc. Además, el análogo o derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Los anticuerpos anteriores pueden usarse en métodos conocidos en la técnica relativos a la localización y actividad de OGTA025, por ejemplo, para visualizar esta proteína, medir sus niveles en muestras fisiológicas apropiadas, en métodos de diagnóstico, etc.

Producción de Aficuerpos para OGTA025

Las moléculas de Aficuerpo representan una nueva clase de proteínas de afinidad con base en un dominio de proteína de 58 residuos de aminoácidos, derivado de uno de los dominios de unión a IgG de la proteína A estafilocócica. Este dominio del haz de tres hélices se ha utilizado como una estructura para la construcción de bibliotecas de fagémidos

combinatorios, a partir de la cual se pueden seleccionar variantes de Aficuerpos que apuntan a las moléculas deseadas usando tecnología de despliegue en fagos (Nord K, Gunneriusson E, Ringdahl J, Stahl S, Uhlen M, Nygren PA, Binding proteins selected from combinatorial libraries of an α -helical bacterial receptor domain, *Nat Biotechnol* 1997; 15, 772-7. Ronmark J, Gronlund H, Uhlen M, Nygren PA, Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, *Eur J Biochem* 2002;269:2647-55.). La estructura simple y robusta de las moléculas de Aficuerpo en combinación con su bajo peso molecular (6 kDa) las hace adecuadas para una amplia variedad de aplicaciones, por ejemplo, como reactivos de detección (Ronmark J, Hansson M, Nguyen T, et al, Construction and characterization of affibody-Fc chimeras produced in *Escherichia coli*, *J Immunol Methods* 2002;261:199-211y para inhibir las interacciones del receptor (Sandstorm K, Xu Z, Forsberg G, Nygren PA, Inhibition of the CD28-CD80 co-stimulation signal by a CD28-binding Affibody ligand developed by combinatorial protein engineering, *Protein Eng* 2003;16:691-7). Pueden obtenerse más detalles de los Aficuerpos y métodos de producción de los mismos mediante referencia a la patente estadounidense No. 5831012.

Los Aficuerpos marcados también pueden ser útiles en aplicaciones de formación de imágenes para determinar la abundancia de isoformas.

Producción de anticuerpos de dominio para OGTA025

Las referencias a anticuerpos aquí incluyen referencias a anticuerpos de dominio. Los anticuerpos de dominio (dAb) son las unidades de unión funcional más pequeñas de los anticuerpos, que corresponden a las regiones variables ya sea de cadenas pesadas (V_H) o ligeras (V_L) de anticuerpos humanos. Los anticuerpos de dominio tienen un peso molecular de aproximadamente 13 kDa. Domantis ha desarrollado una serie de bibliotecas grandes y altamente funcionales de dAb V_H y V_L completamente humanos (más de diez mil millones de secuencias diferentes en cada biblioteca), y utiliza estas bibliotecas para seleccionar dAb que son específicos para objetivos terapéuticos. En contraste con muchos anticuerpos convencionales, los anticuerpos de dominio se expresan bien en sistemas de células de bacterias, levaduras y de mamífero. Pueden obtenerse más detalles de los anticuerpos de dominio y métodos de producción de los mismos por referencia a las patentes estadounidenses Nos. 6.291.158; 6.582.915; 6.593.081; 6.172.197; 6,696,245; la solicitud de patente estadounidense No. 2004/0110941; la solicitud de patente europea No. 1433846 y las patentes europeas Nos. 0368684 y 0616640; los documentos WO05/035572, WO04/101790, WO04/081026, WO04/058821, WO04/003019 y WO03/002609.

Producción de Nanocuerpos para OGTA025

Los Nanocuerpos son proteínas terapéuticas derivadas de anticuerpos que contienen las propiedades estructurales y funcionales únicas de anticuerpos de cadena pesada de origen natural. Estos anticuerpos de cadena pesada contienen un único dominio variable (VHH) y dos dominios constantes (C_H2 y C_H3). Es importante destacar que el dominio VHH clonado y aislado es un polipéptido perfectamente estable que alberga la capacidad completa de unión al antígeno del anticuerpo original de cadena pesada. Los Nanocuerpos tienen una alta homología con los dominios VH de los anticuerpos humanos y pueden humanizarse adicionalmente sin ninguna pérdida de actividad. Es importante destacar que los Nanocuerpos tienen un potencial inmunogénico bajo, lo cual ha sido confirmado en estudios de primates con compuestos guía de Nanocuerpos.

Los Nanocuerpos combinan las ventajas de anticuerpos convencionales con características importantes de fármacos de moléculas pequeñas. Al igual que los anticuerpos convencionales, los Nanocuerpos muestran alta especificidad objetivo, alta afinidad por su objetivo y baja toxicidad inherente. Sin embargo, al igual que los fármacos de moléculas pequeñas, pueden inhibir las enzimas y acceder fácilmente a las hendiduras de los receptores. Además, los Nanocuerpos son extremadamente estables, se pueden administrar por medios distintos a la inyección (véase, por ejemplo, el documento WO 04/041867) y son fáciles de fabricar. Otras ventajas de los Nanocuerpos incluyen el reconocimiento de epítomos no comunes u ocultos como resultado de su pequeño tamaño, la unión a cavidades o sitios activos de objetivos proteicos con alta afinidad y selectividad debido a su única flexibilidad en el formato de fármaco tridimensional, la adaptación de la semivida y facilidad y velocidad de descubrimiento de fármacos.

Los Nanocuerpos están codificados por genes únicos y se producen eficazmente en casi todos los huéspedes procariontes y eucariotes, por ejemplo, *E. coli* (véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 6.765.087), mohos (por ejemplo, *Aspergillus* o *Trichoderma*) y levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* o *Pichia*) (véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 6.838.254). El proceso de producción es escalable y se han producido cantidades de varios kilogramos de Nanocuerpos. Debido a que los Nanocuerpos exhiben una estabilidad superior comparada con los anticuerpos convencionales, se pueden formular como una solución de larga vida útil lista para ser usada.

El método de Nanoclones (véase, por ejemplo, el documento WO 06/079372) es un método patentado para generar Nanocuerpos contra un objetivo deseado, con base en la selección automatizada de alto rendimiento de células B.

Producción de Unicuerpos para OGTA025

Un Unicuerpo es una nueva tecnología patentada de anticuerpos que crea un formato de anticuerpo estable, más pequeño, con una ventana terapéutica más larga que los formatos de anticuerpos pequeños actuales. Los anticuerpos IgG4 se consideran inertes y, por tanto, no interactúan con el sistema inmune. Genmab modificó totalmente los

5 anticuerpos IgG4 humanos eliminando la región bisagra del anticuerpo. A diferencia del anticuerpo IgG4 de tamaño completo, el fragmento de media molécula es muy estable y se denomina Unicuerpo. Reducir a la mitad la molécula de IgG4 dejó sólo un área en el Unicuerpo que puede unirse a los objetivos de la enfermedad y el Unicuerpo por lo tanto se une univalentemente a sólo un sitio en las células objetivo. Esta unión univalente no estimula a las células cancerosas a crecer como los anticuerpos bivalentes y abre la puerta para el tratamiento de algunos tipos de cáncer que los anticuerpos ordinarios no pueden tratar.

El Unicuerpo es aproximadamente la mitad del tamaño de un anticuerpo IgG4 regular. Este pequeño tamaño puede ser un gran beneficio al tratar algunas formas de cáncer, permitiendo una mejor distribución de la molécula sobre tumores sólidos más grandes y potencialmente aumentando la eficacia.

10 Los Fab normalmente no tienen una semivida muy larga. Los Unicuerpos, sin embargo, se eliminaron a una velocidad similar a los anticuerpos IgG4 completos y fueron capaces de unirse, así como anticuerpos enteros y fragmentos de anticuerpos en estudios preclínicos. Otros anticuerpos trabajan principalmente matando las células objetivo mientras que los Unicuerpos sólo inhiben o silencian las células.

Pueden obtenerse más detalles de Unicuerpos con referencia a la patente WO2007/059782.

15 Expresión de reactivos de afinidad

Expresión de anticuerpos

Los anticuerpos para uso en la invención pueden producirse por cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, por síntesis química o por expresión recombinante, y se producen preferiblemente mediante técnicas de expresión recombinantes.

20 La expresión recombinante de anticuerpos, o fragmentos, derivados o análogos de los mismos, requiere la construcción de un ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Si se conoce la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, se puede ensamblar un ácido nucleico que codifica el anticuerpo a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (por ejemplo, como se describe en Kutmeier et al., 1994, *BioTechniques* 17: 242), que, en resumen, implica la síntesis de oligonucleótidos solapantes que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, hibridación y ligación de dichos oligonucleótidos, y luego amplificación de los oligonucleótidos ligados por PCR.

25 Alternativamente, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede obtenerse clonando el anticuerpo. Si no se dispone de un clon que contiene el ácido nucleico que codifica el anticuerpo particular, pero se conoce la secuencia de la molécula de anticuerpo, se puede obtener un ácido nucleico que codifica el anticuerpo a partir de una fuente adecuada (por ejemplo, una biblioteca de ADNc de anticuerpo o biblioteca de ADNc generada a partir de cualquier tejido o células que expresan el anticuerpo) mediante amplificación por PCR usando cebadores sintéticos hibridables con los extremos 3' y 5' de la secuencia o mediante clonación usando una sonda de oligonucleótidos específica para la secuencia génica particular.

30 Si no se dispone de una molécula de anticuerpo que reconozca específicamente un antígeno particular (o una fuente para una biblioteca de ADNc para clonar un ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo), se pueden generar anticuerpos específicos para un antígeno particular por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante la inmunización de un animal, tal como un conejo, para generar anticuerpos policlonales o, más preferiblemente, mediante la generación de anticuerpos monoclonales. Alternativamente, se puede obtener un clon que codifica al menos la porción Fab del anticuerpo explorando bibliotecas de expresión de Fab (por ejemplo, como se describe en Huse et al., 1989, *Science* 246: 1275-1281) para clones de fragmentos Fab que se unen al antígeno específico o mediante cribado de bibliotecas de anticuerpo (véase, por ejemplo, Clackson et al., 1991, *Nature* 352: 624, Hane et al., 1997 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4937).

35 Una vez que se obtiene un ácido nucleico que codifica al menos el dominio variable de la molécula de anticuerpo, se puede introducir en un vector que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula del anticuerpo (véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 86/05807, la publicación PCT WO 89/01036 y la patente estadounidense No. 5.122.464). También están disponibles vectores que contienen la cadena completa ligera o pesada para la coexpresión con el ácido nucleico para permitir la expresión de una molécula completa de anticuerpo. A continuación, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede utilizarse para introducir la sustitución o sustituciones o supresión o supresiones de nucleótidos necesarias para sustituir (o suprimir) uno o más residuos de cisteína de región variable que participan en un enlace disulfuro entre cadenas con un residuo de aminoácido que no contiene un grupo sulfhidrilo. Tales modificaciones pueden llevarse a cabo por cualquier método conocido en la técnica para la introducción de mutaciones o supresiones específicas en una secuencia de nucleótidos, por ejemplo, pero sin limitarse a, mutagénesis química, mutagénesis *in vitro* dirigida al sitio (Hutchinson et al., 1978, *J. Biol. Chem.* 253: 6551), métodos con base en PCT, etc.

40 Además, se pueden utilizar técnicas desarrolladas para la producción de anticuerpos quiméricos (Morrison et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 851-855, Neuberger et al., 1984, *Nature* 312: 604- 608; Takeda et al., 1985, *Nature* 314: 452-454) mediante el empalme de genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad de antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. Como se describió más

arriba, un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, tales como aquellas que tienen una región variable derivada de un mAb murino y una región constante de anticuerpo humano, por ejemplo, anticuerpos humanizados.

Una vez que se ha obtenido un ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo para uso en la invención, el vector para la producción de la molécula de anticuerpo puede producirse mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en el arte. De este modo, se describen aquí métodos para preparar la proteína de la descripción mediante la expresión de ácido nucleico que contiene las secuencias de moléculas de anticuerpo. Pueden usarse métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen secuencias de codificación de una molécula de anticuerpo y señales de control de transcripción y de traducción apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas, y recombinación genética *in vivo*. Véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al. (1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) y Ausubel et al. (Eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley y Sons, NY).

El vector de expresión se transfiere a una célula huésped por técnicas convencionales y las células transfectadas se cultivan después mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo para uso en la invención.

Las células huésped usadas para expresar un anticuerpo recombinante para uso en la invención pueden ser o bien células bacterianas tales como *Escherichia coli* o, preferiblemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de moléculas de anticuerpo recombinante completas. En particular, las células de mamífero tales como las células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector tal como el elemento promotor del gen temprano intermedio principal del citomegalovirus humano, son un sistema de expresión efectivo para anticuerpos (Foecking et al., 1986, Gene 45: 101, Cockett et al., 1990, Bio/Technology 8: 2).

Se puede utilizar una variedad de sistemas de vectores de expresión huésped para expresar una molécula de anticuerpo para su uso en la invención. Tales sistemas de expresión del huésped representan vehículos mediante los cuales las secuencias codificantes de interés pueden producirse y purificarse posteriormente, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias apropiadas de codificación de nucleótidos, expresar la molécula de anticuerpo para uso en la invención *in situ*. Estos incluyen pero no se limitan a microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con ADN de bacteriófago recombinante, ADN de plásmido o vectores de expresión de ADN de cósmido que contienen secuencias que codifican anticuerpos; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias codificadoras de anticuerpos; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen las secuencias codificantes del anticuerpo; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV, virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que albergan constructos de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor de 7.5K del virus vacuna).

En sistemas bacterianos, se pueden seleccionar ventajosamente varios vectores de expresión que dependen del uso pretendido para la molécula de anticuerpo que se va a expresar. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de dicha proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que son fácilmente purificados. Tales vectores incluyen, pero no se limitan, al vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther et al., 1983, EMBO J. 2: 1791), en el que la secuencia codificadora del anticuerpo puede ligarse individualmente en el vector en el marco con la región de codificación lac Z para que se produzca una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye e Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13: 3101-3109, Van Heeke y Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24: 5503-5509); y similares. también se pueden usar vectores pGEX para expresar polipéptidos foráneos como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas mediante adsorción y unión a una matriz de perlas de glutatión-agarosa, seguido por elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir sitios de escisión de trombina o factor Xa de proteasa de manera que el producto génico objetivo clonado pueda ser liberado de la fracción GST.

En un sistema de insectos, se utiliza el virus polihedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV) como un vector para expresar genes foráneos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia que codifica el anticuerpo se puede clonar individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de polihedrina) del virus y se coloca bajo el control de un promotor AcNPV (por ejemplo, el promotor de polihedrina). En células huésped de mamífero, pueden utilizarse varios sistemas de expresión basados en virus (por ejemplo, un sistema de expresión de adenovirus).

Como se discutió anteriormente, se puede escoger una cepa de célula huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico de la manera específica deseada. Tales modificaciones

(por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína.

5 Para la producción a largo plazo y de alto rendimiento de anticuerpos recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, se pueden producir líneas celulares que expresan de forma estable un anticuerpo de interés transfectando las células con un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos del anticuerpo y la secuencia de nucleótidos de un antibiótico seleccionable (por ejemplo, neomicina o higromicina) y selección para la expresión del marcador seleccionable. Tales líneas celulares modificadas pueden ser particularmente útiles en el cribado y evaluación de compuestos que interactúan directa o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

10 Los niveles de expresión de la molécula de anticuerpo pueden aumentarse mediante amplificación vectorial (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Vol.3. (Academic Press, New York, 1987)). Cuando se puede amplificar un marcador en el sistema del vector que expresa el anticuerpo, el aumento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Puesto que la región amplificada está asociada con el gen del anticuerpo, la producción del anticuerpo también aumentará (Crouse et al., 1983, *Mol. Cell. Biol.* 3: 257).

15 La célula huésped puede ser cotransfectada con dos vectores de expresión de la descripción, el primer vector que codifica un polipéptido derivado de cadena pesada y el segundo vector que codifica un polipéptido derivado de cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten una expresión igual de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Alternativamente, puede usarse un único vector que codifique tanto polipéptidos de cadena pesada como de cadena ligera. En tales situaciones, la cadena ligera debe colocarse antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre de tóxicos (Proudfoot, 1986, *Nature* 322: 52, Kohler, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2197). Las secuencias de codificación para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

20 Una vez que la molécula de anticuerpo para uso en la invención ha sido expresada de forma recombinante, puede purificarse por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de anticuerpo, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad tal como con proteína A o antígeno específico y cromatografía en columna por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas.

25 Alternativamente, cualquier proteína de fusión puede purificarse fácilmente utilizando un anticuerpo específico para la proteína de fusión que se expresa. Por ejemplo, un sistema descrito por Janknecht et al., permite la purificación fácil de proteínas de fusión no desnaturalizadas expresadas en líneas celulares humanas (Janknecht et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 8972-897). En este sistema, el gen de interés se subclona en un plásmido de recombinación de vacuna de tal manera que el marco de lectura abierto del gen se fusiona de forma traduccional a una etiqueta aminoterminal que consiste en seis residuos de histidina. La etiqueta sirve como un dominio de unión a la matriz para la proteína de fusión. Los extractos de células infectadas con el virus vacuna recombinante se cargan en columnas de Ni²⁺ ácido nitriloacético-agarosa y se eluyen selectivamente proteínas marcadas con histidina con reguladores que contienen imidazol.

30 Los anticuerpos que se generan mediante estos métodos pueden ser luego seleccionados mediante un primer cribado para afinidad y especificidad con el polipéptido purificado de interés y, si es necesario, comparar los resultados con la afinidad y especificidad de los anticuerpos con polipéptidos que se desean excluir de la unión. El procedimiento de cribado puede involucrar inmovilización de los polipéptidos purificados en pozos separados de placas de microtitulación. La solución que contiene un anticuerpo potencial o grupos de anticuerpos se coloca a continuación en los respectivos pozos de microtitulación y se incuba durante aproximadamente 30 minutos a 2 h. Los pozos de microtitulación se lavan a continuación y un anticuerpo secundario marcado (por ejemplo, un anticuerpo anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina si los anticuerpos elevados son anticuerpos de ratón) se añade a los pozos y se incuba durante aproximadamente 30 minutos y después se lava. Se añade sustrato a los pozos y aparecerá una reacción de color cuando está presente el anticuerpo con el polipéptido o polipéptidos inmovilizados.

35 Los anticuerpos así identificados pueden analizarse posteriormente en cuanto a afinidad y especificidad en el diseño del ensayo seleccionado. En el desarrollo de inmunoensayos para una proteína objetivo, la proteína objetivo purificada actúa como un patrón con el cual juzgar la sensibilidad y especificidad del inmunoensayo usando los anticuerpos que se han seleccionado. Debido a que la afinidad de unión de diversos anticuerpos puede diferir, ciertos pares de anticuerpos (por ejemplo, en ensayos tipo sándwich) pueden interferir entre sí en forma estérica, etc., el rendimiento de ensayo de un anticuerpo puede ser una medida más importante que la afinidad absoluta y la especificidad de un anticuerpo.

40 Los expertos en la técnica reconocerán que se pueden adoptar muchos enfoques para producir anticuerpos o fragmentos de unión y cribar y seleccionar con respecto a la afinidad y especificidad para los diversos polipéptidos, pero estos enfoques no cambian el alcance de la invención.

45 Para aplicaciones terapéuticas, los anticuerpos (particularmente anticuerpos monoclonales) pueden ser adecuadamente anticuerpos animales humanos o humanizados (por ejemplo, de ratón). Los anticuerpos animales se pueden aumentar en animales usando la proteína humana (por ejemplo, OGTA025) como inmunógeno. La humanización típicamente

implica el injerto de CDR identificadas de este modo en regiones marco humanas. Normalmente se requiere alguna retromutación posterior para optimizar la conformación de cadenas. Dichos procedimientos son conocidos por los expertos en la técnica.

Expresión de Aficuerpos

- 5 La construcción de Aficuerpos se ha descrito en otra parte (Ronmark J, Gronlund H, Uhle' n, M., Nygren P.A°, Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, 2002, Eur. J. Biochem. 269, 2647-2655.), incluyendo la construcción de bibliotecas de despliegue en fagos de Aficuerpos (Nord, K., Nilsson, J., Nilsson, B., Uhle' n, M. & Nygren, P.A°, A combinatorial library of an a-helical bacterial receptor domain, 1995, Protein Eng. 8, 601-608. Nord, K., Gunneriusson, E., Ringdahl, J., Sta° hl, S., Uhle'n, M. & Nygren, P.A°, Binding proteins selected from combinatorial libraries of an a-helical bacterial receptor domain, 1997, Nat. Biotechnol.15, 772-777).

Los análisis de los biosensores para investigar las variantes óptimas de Aficuerpos usando estudios de unión a biosensores también se han descrito en otra parte (Ronmark J, Gronlund H, Uhle' n, M., Nygren P.A°, Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, 2002, Eur. J. Biochem. 269, 2647-2655).

- 15 Reactivos de afinidad con el conjugado

En un ejemplo, los reactivos de afinidad anti-OGTA025, tales como anticuerpos o fragmentos de los mismos, se conjugan con una fracción diagnóstica o terapéutica. Los anticuerpos se pueden usar para diagnóstico o para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede ser facilitada mediante el acoplamiento del anticuerpo a una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos protésicos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, nucleídos radioactivos, metales emisores de positrones (para uso en tomografía de emisión de positrones) y iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase en general la patente estadounidense No. 4.741.900 para iones metálicos que pueden ser conjugados con anticuerpos para uso diagnóstico de acuerdo con la presente descripción. Las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; los grupos protésicos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo y ficoeritrina; los materiales luminiscentes adecuados incluyen luminol; los materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y los nucleídos radioactivos adecuados incluyen ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹¹¹In y ⁹⁹Tc. También se puede emplear ⁶⁸Ga.

- 30 Los anticuerpos anti-OGTA025 o fragmentos de los mismos pueden conjugarse con un agente terapéutico o una fracción de fármaco para modificar una respuesta biológica dada. El agente terapéutico o la fracción de fármaco no debe interpretarse como limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la fracción de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina diftérica; Una proteína tal como el factor de necrosis tumoral, α-interferón, β-interferón, factor de crecimiento de nervios, plaquetas derivadas del factor de crecimiento, activador de plasminógeno de tejido, un agente trombotico o un agente antiangiogénico, por ejemplo angiostatina o endostatina; o un modificador de la respuesta biológica tal como linfoquina, interleuquina 1 (IL-1), interleuquina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), Factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento de nervios (NGF) u otro factor de crecimiento.

Las técnicas para la conjugación de dicha fracción terapéutica con anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo,

- 45 Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), páginas 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), páginas 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), páginas 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), páginas 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982).

- 50 Alternativamente, se puede conjugar un anticuerpo con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo como lo describe Segal en la patente estadounidense No. 4.676.980.

Un anticuerpo con o sin una fracción terapéutica conjugada al mismo puede ser utilizado como un agente terapéutico que se administra solo o en combinación con un factor o factores citotóxicos y/o una citoquina o citoquinas.

Diagnóstico de CHC, Glioblastoma y Cáncer de Pulmón

- 55 De acuerdo con la presente descripción, se pueden usar para diagnóstico o seguimiento muestras de hígado, glioblastoma o tejido pulmonar, suero, plasma u orina obtenidos de un sujeto que se sospecha que tiene o que se sabe

que tiene CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón. En un ejemplo, un cambio en la abundancia de OGTA025 en una muestra de ensayo con relación a una muestra de control (de un sujeto o sujetos libres de CHC, glioblastoma y cáncer de pulmón) o un intervalo de referencia previamente determinado indica la presencia de CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón. En otro ejemplo, la abundancia relativa de OGTA025 en una muestra de ensayo en comparación con una muestra de control o un intervalo de referencia previamente determinado indica un subtipo de CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón (por ejemplo, CHC fibrolamelar o carcinoma de pulmón de células escamosas). En otro ejemplo más, la abundancia relativa de OGTA025 en una muestra de ensayo con respecto a una muestra de control o un intervalo de referencia previamente determinado indica el grado o la gravedad de CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón (por ejemplo, la probabilidad de metástasis). En cualquiera de los métodos antes mencionados, la detección de OGTA025 puede combinarse opcionalmente con la detección de uno o más biomarcadores adicionales para CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón. Se puede emplear cualquier método adecuado en la técnica para medir el nivel de OGTA025, incluyendo, pero sin limitarse a la tecnología preferida descrita aquí, ensayos de quinasa, inmunoensayos para detectar y/o visualizar OGTA025 (por ejemplo, transferencias Western, inmunoprecipitación seguida de electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio, inmunocitoquímica, etc.). En un ejemplo adicional, un cambio en la abundancia de ARNm que codifica OGTA025 en una muestra de ensayo con respecto a una muestra de control o un intervalo de referencia previamente determinado indica la presencia de CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón. Puede usarse cualquier ensayo de hibridación adecuado para detectar la expresión de OGTA025 mediante la detección y/o visualización del ARNm que codifica el OGTA025 (por ejemplo, ensayos de Northern, transferencias puntuales, hibridación *in situ*, etc.).

En otro ejemplo de la descripción, se pueden usar anticuerpos marcados (u otros reactivos de afinidad tales como Aficuerpos, Nanocuerpos o Unicuerpos), derivados y análogos de los mismos, que se unen específicamente a OGTA025 para fines de diagnóstico para detectar, diagnosticar o controlar CHC, glioblastoma y cáncer de pulmón. Preferiblemente, se detecta CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón en un animal, más preferiblemente en un mamífero y lo más preferiblemente en un ser humano.

25 Ensayos de detección

La descripción proporciona métodos para identificar agentes (por ejemplo, compuestos candidatos o compuestos de prueba) que se unen a OGTA025 o tienen un efecto estimulador o inhibidor sobre la expresión o actividad de OGTA025. La divulgación también proporciona métodos para identificar agentes, compuestos candidatos o compuestos de prueba que se unen a un polipéptido relacionado con OGTA025 o una proteína de fusión OGTA025 o tienen un efecto estimulador o inhibidor sobre la expresión o actividad de un polipéptido relacionado con OGTA025 o una proteína de fusión OGTA025. Ejemplos de agentes, compuestos candidatos o compuestos de prueba incluyen, pero no se limitan a, ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN y ARN), carbohidratos, lípidos, proteínas, péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas y otros fármacos. Los agentes se pueden obtener usando cualquiera de los numerosos enfoques en métodos de biblioteca combinatoria conocidos en la técnica, que incluyen: bibliotecas biológicas; bibliotecas de fase sólida paralela espacialmente direccionables o fase de solución; métodos de biblioteca sintética que requieren deconvolución; el método de biblioteca de "una perla un compuesto"; y métodos de biblioteca sintética usando selección por cromatografía de afinidad. El enfoque de biblioteca biológica se limita a bibliotecas de péptidos, mientras que los otros cuatro enfoques son aplicables a bibliotecas de compuestos de péptidos, oligómeros no peptídicos o moléculas pequeñas (Lam, 1997, *Anticancer Drug Des.* 12: 145, patentes estadounidenses Nos. 5.738.996 y 5.807.683).

Ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares se pueden encontrar en la técnica, por ejemplo, en: DeWitt et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6909; Erb et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11422; Zuckermann et al., 1994, *J. Med. Chem.* 37: 2678; Cho et al., 1993, *Science* 261: 1303; Carrell et al., 1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2059; Carrell et al., 1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2061; y Gallop et al., 1994, *J. Med. Chem.* 37: 1233.

Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse, por ejemplo, en solución (por ejemplo, Houghten, 1992, *Bio/Techniques* 13: 412-421), o sobre perlas (Lam, 1991, *Nature* 354: 82-84), chips (Fodor, 1993, *Nature* 364: 555 - 556), bacterias (patente estadounidense No. 5.223.409), esporas (patentes estadounidenses Nos. 5.571.698, 5.403.484 y 5.223.409), plásmidos (Cull et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. USA* 89: 1865-1869) o fagos (Scott y Smith, 1990, *Science* 249: 386 - 390, Devlin, 1990, *Science* 249: 404 - 406; Cwirla et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. USA* 87: 6378 - 6382 y Felici, 1991, *J. Mol. Biol.* 222: 301-310).

En un ejemplo, los agentes que interactúan (es decir, se unen a) OGTA025, un fragmento de OGTA025 (por ejemplo, un fragmento funcionalmente activo), un polipéptido relacionado con OGTA025, un fragmento de un polipéptido relacionado con OGTA025 o una proteína de fusión OGTA025 se identifican en un sistema de ensayo con base en células. De acuerdo con este ejemplo, las células que expresan OGTA025, un fragmento de un OGTA025, un polipéptido relacionado con OGTA025, un fragmento del polipéptido relacionado con OGTA025 o una proteína de fusión OGTA025 se ponen en contacto con un compuesto candidato o un compuesto de control y se determina la capacidad del compuesto candidato para interactuar con el OGTA025. Si se desea, este ensayo puede usarse para cribar una pluralidad (por ejemplo, una biblioteca) de compuestos candidatos. La célula, por ejemplo, puede ser de origen procariota (por ejemplo, *E. coli*) o un origen eucariota (por ejemplo, levadura o mamífero). Además, las células pueden expresar OGTA025, un fragmento de OGTA025, un polipéptido relacionado con OGTA025, un fragmento del polipéptido relacionado con OGTA025 o una proteína de fusión OGTA025 de forma endógena o ser modificados genéticamente

5 para expresar OGTA025, un fragmento de OGTA025, un polipéptido relacionado con OGTA025, un fragmento de polipéptido relacionado con OGTA025, o una proteína de fusión OGTA025. En ciertos casos, se marca OGTA025, un fragmento de OGTA025, un polipéptido relacionado con OGTA025, un fragmento del polipéptido relacionado con OGTA025, o una proteína de fusión OGTA025 o el compuesto candidato, se marca, por ejemplo, con un marcador radioactivo (tal como ³²P, ³⁵S y ¹²⁵I) o un marcador fluorescente (tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído o fluorescamina) para permitir la detección de una interacción entre OGTA025 y un compuesto candidato. La capacidad del compuesto candidato para interactuar directa o indirectamente con OGTA025, un fragmento de OGTA025, un polipéptido relacionado con OGTA025, un fragmento de un polipéptido relacionado con OGTA025 o una proteína de fusión OGTA025 puede determinarse por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la interacción entre un compuesto candidato y OGTA025, un polipéptido relacionado con OGTA025, un fragmento de un polipéptido relacionado con OGTA025 o una proteína de fusión OGTA025 puede determinarse mediante citometría de flujo, un ensayo de centelleo, un análisis de inmunoprecipitación o de transferencia Western.

15 En otro ejemplo, los agentes que interactúan con (es decir, se unen a) OGTA025, un fragmento OGTA025 (por ejemplo, un fragmento funcionalmente activo), un polipéptido relacionado con OGTA025, un fragmento de un polipéptido relacionado con OGTA025 o una proteína de fusión OGTA025 se identifican en un sistema de ensayo libre de células. De acuerdo con este ejemplo, se pone en contacto un OGTA025 nativo o recombinante o un fragmento del mismo, o un polipéptido relacionado con OGTA025 nativo o recombinante o fragmento del mismo, o una proteína de fusión OGTA025 o fragmento del mismo, con un compuesto candidato o un compuesto de control y se determina la capacidad del compuesto candidato para interactuar con OGTA025 o el polipéptido relacionado con OGTA025, o la proteína de fusión OGTA025. Si se desea, este ensayo se puede usar para cribar una pluralidad (por ejemplo, una biblioteca) de compuestos candidatos. Preferiblemente, se inmoviliza primero OGTA025, un fragmento OGTA025, un polipéptido relacionado con OGTA025, un fragmento de un polipéptido relacionado con OGTA025, o una proteína de fusión OGTA025, por ejemplo poniendo en contacto OGTA025, un fragmento OGTA025, un polipéptido relacionado con OGTA025, un fragmento de un polipéptido relacionado con OGTA025, o una proteína de fusión OGTA025 con un anticuerpo inmovilizado (u otro reactivo de afinidad tal como un Aficuerpo, Nanocuerpo o Unicuerpo) que lo reconoce específicamente y se une a él, o poniendo en contacto una preparación purificada de OGTA025, un fragmento de OGTA025, un polipéptido relacionado con OGTA025, un fragmento de un polipéptido relacionado con OGTA025, o una proteína de fusión OGTA025 con una superficie diseñada para unirse a proteínas. OGTA025, un fragmento OGTA025, un polipéptido relacionado con OGTA025, un fragmento de un polipéptido relacionado con OGTA025 o una proteína de fusión OGTA025 pueden estar parcial o completamente purificados (por ejemplo, parcial o completamente libres de otros polipéptidos) o ser parte de un lisado celular. Además, OGTA025, un fragmento OGTA025, un polipéptido relacionado con OGTA025, un fragmento de un polipéptido relacionado con OGTA025 puede ser una proteína de fusión que comprende OGTA025 o una porción biológicamente activa de la misma, o un polipéptido relacionado con OGTA025 y un dominio tal como glutatión S-transferasa. Alternativamente, se puede biotinilar OGTA025, un fragmento OGTA025, un polipéptido relacionado con OGTA025, un fragmento de un polipéptido relacionado con OGTA025 o una proteína de fusión OGTA025 usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica (por ejemplo, kit de biotilación, Pierce Chemicals; Rockford, IL). La capacidad del compuesto candidato para interactuar con OGTA025, un fragmento OGTA025, un polipéptido relacionado con OGTA025, un fragmento de un polipéptido relacionado con OGTA025 o una proteína de fusión OGTA025 puede determinarse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

45 En otro ejemplo, se utiliza un sistema de ensayo con base en células para identificar agentes que se unen o modulan la actividad de una proteína, tal como una enzima, o una porción biológicamente activa de la misma, que es responsable de la producción o degradación de OGTA025 o es responsable de la modificación postraduccional de OGTA025. En un cribado primario, se pone en contacto una pluralidad (por ejemplo, una biblioteca) de compuestos con células que expresan en forma natural o recombinante: (i) OGTA025, una isoforma de OGTA025, un homólogo de OGTA025, un polipéptido relacionado con OGTA025, una proteína de fusión OGTA025, o un fragmento biológicamente activo de cualquiera de los anteriores; y (ii) una proteína que es responsable del procesamiento de OGTA025, la isoforma de OGTA025, el homólogo de OGTA025, el polipéptido relacionado con OGTA025, la proteína de fusión OGTA025 o un fragmento con el fin de identificar compuestos que modulan la producción, degradación o modificación postraduccional de OGTA025, la isoforma de OGTA025, el homólogo de OGTA025, el polipéptido relacionado con OGTA025, la proteína de fusión OGTA025 o un fragmento. Si se desea, los compuestos identificados en el cribado primaria pueden ser luego analizados en un cribado secundario contra células que expresan de forma natural o recombinante OGTA025. La capacidad del compuesto candidato para modular la producción, degradación o modificación postraduccional de OGTA025, isoforma, homólogo, polipéptido relacionado con OGTA025 o proteína de fusión OGTA025 puede determinarse por métodos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo sin limitación, citometría de flujo, un ensayo de centelleo, inmunoprecipitación y análisis de transferencia Western.

60 En otro ejemplo, los agentes que interactúan competitivamente con (es decir, se unen a) OGTA025, un fragmento OGTA025, un polipéptido relacionado con OGTA025, un fragmento de un polipéptido relacionado con OGTA025 o una proteína de fusión OGTA025 se identifican en un ensayo de unión competitiva. De acuerdo con este ejemplo, se ponen en contacto células que expresan OGTA025, un fragmento OGTA025, un polipéptido relacionado con OGTA025, un fragmento de un polipéptido relacionado con OGTA025, o una proteína de fusión OGTA025 con un compuesto candidato y un compuesto que se sabe que interactúa con OGTA025, se determina a continuación la capacidad del compuesto candidato para interactuar preferencialmente con un OGTA025, un polipéptido relacionado con OGTA025,

un fragmento de un polipéptido relacionado con OGTA025 o una proteína de fusión OGTA025. Alternativamente, se identifican agentes que interactúan preferentemente con (es decir, se unen a) OGTA025, un fragmento OGTA025, un polipéptido relacionado con OGTA025 o un fragmento de un polipéptido relacionado con OGTA025 en un sistema de ensayo libre de células poniendo en contacto OGTA025, un fragmento OGTA025, un polipéptido relacionado con OGTA025, un fragmento de un polipéptido relacionado con OGTA025, o una proteína de fusión OGTA025 con un compuesto candidato y un compuesto que se sabe que interactúa con OGTA025, el polipéptido relacionado con OGTA025 o la proteína de fusión OGTA025. Como se ha indicado anteriormente, puede determinarse la capacidad del compuesto candidato para interactuar con OGTA025, un fragmento OGTA025, un polipéptido relacionado con OGTA025, un fragmento de un polipéptido relacionado con OGTA025 o una proteína de fusión OGTA025 mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Estos ensayos, ya sea con base en células o libres de células, pueden usarse para cribar una pluralidad (por ejemplo, una biblioteca) de compuestos candidatos.

En otro ejemplo, se identifican los agentes que modulan (es decir, sobrerregulan o subregulan) la expresión o actividad de OGTA025 o un polipéptido relacionado con OGTA025 poniendo en contacto las células (por ejemplo, células de origen procarionota o de origen eucariota) que expresan OGTA025, o el polipéptido relacionado con OGTA025 con un compuesto candidato o un compuesto de control (por ejemplo, solución salina regulada con fosfato (PBS)) y se determina la expresión de OGTA025, el polipéptido relacionado con OGTA025 o la proteína de fusión OGTA025, ARNm que codifica OGTA025 o un ARNm que codifica el polipéptido relacionado con OGTA025. El nivel de expresión de OGTA025, el polipéptido relacionado con OGTA025, ARNm que codifica OGTA025 o ARNm que codifica el polipéptido relacionado con OGTA025 en presencia del compuesto candidato se compara con el nivel de expresión de OGTA025, el polipéptido relacionado con OGTA025, el ARNm que codifica OGTA025, o ARNm que codifica el polipéptido relacionado con OGTA025 en ausencia del compuesto candidato (por ejemplo, en presencia de un compuesto de control). El compuesto candidato se puede identificar entonces como un modulador de la expresión de OGTA025, o el polipéptido relacionado con OGTA025 con base en esta comparación. Por ejemplo, cuando la expresión de OGTA025 o de ARNm es significativamente mayor en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como un estimulador de la expresión de OGTA025 o ARNm. Alternativamente, cuando la expresión de OGTA025 o ARNm es significativamente menor en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como un inhibidor de la expresión de OGTA025 o ARNm. El nivel de expresión de OGTA025 o el ARNm que lo codifica puede determinarse por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la expresión de ARNm se puede evaluar mediante análisis de transferencia Northern o RT-PCR, y los niveles de proteína se pueden evaluar mediante análisis de transferencia Western.

En otro ejemplo, los agentes que modulan la actividad de OGTA025 o un polipéptido relacionado con OGTA025 se identifican poniendo en contacto una preparación que contiene OGTA025 o el polipéptido relacionado con OGTA025 o células (por ejemplo, células procarionotas o eucariotas) que expresan OGTA025 o el polipéptido relacionado con OGTA025 con un compuesto de prueba o un compuesto de control y determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular (por ejemplo, estimular o inhibir) la actividad de OGTA025 o al polipéptido relacionado con OGTA025. La actividad de OGTA025 o un polipéptido relacionado con OGTA025 se puede evaluar detectando la inducción de una ruta de transducción de la señal celular de OGTA025 o el polipéptido relacionado con OGTA025 (por ejemplo, Ca^{2+} intracelular, diacilglicerol, IP3, etc.) detectando la actividad catalítica o enzimática del objetivo sobre un sustrato adecuado, detectando la inducción de un gen informador (por ejemplo, un elemento regulador que es sensible a OGTA025 o un polipéptido relacionado con OGTA025 y está operativamente enlazado a un ácido nucleico que codifica un marcador detectable, por ejemplo, Luciferasa), o detectando una respuesta celular, por ejemplo, diferenciación celular, o proliferación celular. Con base en la presente descripción, se pueden usar técnicas conocidas por los expertos en el arte para medir estas actividades (véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 5.401.639). El compuesto candidato puede ser luego identificado como un modulador de la actividad de OGTA025 o un polipéptido relacionado con OGTA025 comparando los efectos del compuesto candidato con el compuesto de control. Los compuestos de control adecuados incluyen solución salina regulada con fosfato (PBS) y solución salina normal (NS).

En otro ejemplo, se identifican en un modelo animal los agentes que modulan (es decir, sobrerregulan o subregulan) o tanto la expresión, como la actividad de OGTA025 o un polipéptido relacionado con OGTA025. Los ejemplos de animales adecuados incluyen, pero no se limitan a, ratones, ratas, conejos, monos, conejillos de indias, perros y gatos. Preferiblemente, el animal utilizado representa un modelo de CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón (por ejemplo, xenoinjertos de líneas celulares de CHC tales como MCHC97 en ratones desnudos, Tian et al., Br J Cancer 1999 Nov.; 81 (5): 814-21; xenoinjertos de líneas celulares de glioblastoma tales como U87MG en ratones desnudos, Abernathy et al., Neurosurgery 1988 Mayo; 22 (5): 877-81 o xenoinjertos de líneas celulares de cáncer de pulmón de células pequeñas tales como A549 y H460 y xenoinjertos de líneas celulares de cáncer de pulmón de células pequeñas tales como NCI-H345 o NCI-H69). Estas pueden ser utilizadas para probar compuestos que modulan los niveles de OGTA025, ya que la patología exhibida en estos modelos es similar a aquella de CHC, glioblastoma y cáncer de pulmón. De acuerdo con este ejemplo, se administra el compuesto de prueba o un compuesto de control (por ejemplo, en forma oral, rectal o parenteral, tal como en forma intraperitoneal o intravenosa) a un animal adecuado y se determina el efecto sobre la expresión, actividad o tanto la expresión como la actividad de OGTA025 o un polipéptido relacionado con OGTA025. Los cambios en la expresión de OGTA025 o un polipéptido relacionado con OGTA025 pueden evaluarse mediante los métodos descritos anteriormente.

5 En aún otro ejemplo, OGTA025 o un polipéptido relacionado con OGTA025 se utiliza como una "proteína cebo" en un ensayo de dos híbridos o ensayo de tres híbridos para identificar otras proteínas que se unen o interactúan con OGTA025 o un polipéptido relacionado con OGTA025 (véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 5.283.317, Zervos et al., (1993) Cell 72: 223-232, Madura et al (1993) J. Biol. Chem. 268: 12046-12054, Bartel et al., Bio/Techniques 14: 920 - 924, Iwabuchi et al. (1993) Oncogene 8: 1693 - 1669 y la publicación PCT N° WO 94/10300). Como apreciarán los expertos en la técnica, es probable que tales proteínas de unión estén implicadas en la propagación de señales por OGTA025 como, por ejemplo, elementos secuencia arriba o secuencia abajo de una ruta de señalización que implica OGTA025.

10 Esta descripción proporciona además nuevos agentes identificados mediante los ensayos de cribado descritos anteriormente y sus usos para tratamientos como se describe en la presente memoria. Además, la divulgación también proporciona el uso de un agente que interactúa con, o modula la actividad de OGTA025 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón.

Uso terapéutico de OGTA025

15 La invención proporciona el tratamiento o la prevención de cáncer de pulmón de células pequeñas mediante la administración de un anticuerpo terapéutico o fragmento de unión a antígeno, conjugado con un resto terapéutico. En el presente documento se describen compuestos que incluyen pero no se limitan a: OGTA025, análogos de OGTA025, polipéptidos relacionados con OGTA025 y derivados (incluyendo fragmentos) de los mismos; anticuerpos (u otros reactivos de afinidad tales como Aficuerpos, Nanocuerpos o Unicuerpos) para los anteriores; ácidos nucleicos que codifican OGTA025, análogos de OGTA025, polipéptidos relacionados con OGTA025 y fragmentos de los mismos; 20 ácidos nucleicos antisentido para un gen que codifica OGTA025 o un polipéptido relacionado con OGTA025; y un modulador (por ejemplo, agonistas y antagonistas) de un gen que codifica OGTA025 o un polipéptido relacionado con OGTA025. Una característica importante de la presente descripción es la identificación de genes que codifican OGTA025 implicados en CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón. CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón pueden ser tratados (por ejemplo, para mejorar los síntomas o para retardar el inicio o la progresión) o para prevenir mediante la 25 administración de un compuesto terapéutico que reduce la función o expresión de OGTA025 en el suero o tejido de sujetos que tienen CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón.

En un ejemplo, se administran uno o más anticuerpos (u otros reactivos de afinidad tales como Aficuerpos, Nanocuerpos o Unicuerpos) que se unen específicamente a OGTA025 solos o en combinación con uno o más compuestos terapéuticos adicionales o tratamientos.

30 Preferiblemente, un producto biológico tal como un anticuerpo (u otro reactivo de afinidad tal como un Aficuerpo, Nanocuerpo o Unicuerpo) es alogénico al sujeto al que se administra. En una realización preferida, se administra un anticuerpo (u otro reactivo de afinidad tal como un Aficuerpo, Nanocuerpo o Unicuerpo) a un OGTA025 humano o un polipéptido relacionado con OGTA025 humano, a un sujeto humano para terapia (por ejemplo, para mejorar los síntomas o para retrasar el inicio o progresión) o profilaxis.

35 Sin estar limitado por la teoría, se concibe que la actividad terapéutica de los anticuerpos (u otros reactivos de afinidad tales como Aficuerpos, Nanocuerpos o Unicuerpos) que se unen específicamente a OGTA025 puede lograrse a través del fenómeno de la citotoxicidad mediada por células dependientes del anticuerpo (ADCC) (véase, por ejemplo, Janeway Jr. CA et al., Immunobiology, 5ª ed., 2001, Garland Publishing, ISBN 0-8153-3642-X, Pier GB et al., Immunology, Infection and Immunity, 2004, páginas 246-5, Albanell J. et al., Advances in Experimental Medicine and 40 Biology, 2003, 532: páginas 2153-68 y Weng, W.-K. et al., Journal of Clinical Oncology, 2003, 21: páginas 3940- 3947).

Tratamiento y prevención de CHC, glioblastoma y cáncer de pulmón

45 CHC, el glioblastoma o el cáncer de pulmón se tratan o se previenen mediante la administración a un sujeto que se sospecha que tiene CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón o que está en riesgo de desarrollar CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón de un compuesto que modula (es decir, aumenta o disminuye) el nivel o actividad (es decir, la función) de OGTA025 que está presente diferencialmente en el suero o tejido de sujetos que tienen CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón en comparación con el suero o tejido de sujetos libres de CHC, glioblastoma y cáncer de pulmón. En un ejemplo, se trata o previene CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón mediante la administración a un sujeto que se sospecha que tiene o se sabe que tiene CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón o que está en riesgo de desarrollar 50 CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón, un compuesto que sobrerregula (es decir, aumenta) el nivel o actividad (es decir, la función) de OGTA025 que están disminuidos en el suero o tejido de sujetos que tienen CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón. Ejemplos de tal compuesto incluyen, pero no se limitan a, oligonucleótidos antisentido OGTA025, ribozimas, anticuerpos (u otros reactivos de afinidad tales como Aficuerpos, Nanocuerpos o Unicuerpos) dirigidos contra OGTA025, y compuestos que inhiben la actividad enzimática de OGTA025. Otros compuestos útiles, por ejemplo, los antagonistas de OGTA025 y los antagonistas OGTA025 de molécula pequeña, pueden identificarse usando ensayos *in vitro*. 55

CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón también se tratan o se previenen mediante la administración a un sujeto que se sospecha que tiene CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón o que está en riesgo de desarrollar CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón de un compuesto que subregula el nivel o actividad (es decir, la función) de OGTA025 que se

5 incrementan en el suero o tejido de sujetos que tienen CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón. Ejemplos de tal compuesto incluyen, pero no se limitan a: OGTA025, fragmentos de OGTA025 y polipéptidos relacionados con OGTA025; ácidos nucleicos que codifican OGTA025, un fragmento de OGTA025 y un polipéptido relacionado con OGTA025 (por ejemplo, para uso en terapia génica); y, para aquellos OGTA025 o polipéptidos relacionados con OGTA025 con actividad enzimática, compuestos o moléculas conocidos para modular esa actividad enzimática. Otros compuestos que se pueden usar, por ejemplo, agonistas de OGTA025, pueden identificarse usando ensayos *in vitro*.

10 En una realización preferida, la terapia o profilaxis se adapta a las necesidades de un sujeto individual. Por lo tanto, en ejemplos específicos, los compuestos que promueven el nivel o función de OGTA025 se administran terapéutica o profilácticamente a un sujeto que se sospecha que tiene o se sabe que tiene CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón, en el que los niveles o funciones de OGTA025 están ausentes o están disminuidos con respecto a un control o intervalo de referencia normal. En otros ejemplos, los compuestos que promueven el nivel o función de OGTA025 se administran terapéutica o profilácticamente a un sujeto que se sospecha que tiene o se sabe que tiene CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón en el que los niveles o funciones de OGTA025 se aumentan con relación a un control o a un intervalo de referencia. En otros ejemplos, los compuestos que disminuyen el nivel o función de OGTA025 se administran terapéutica o profilácticamente a un sujeto que se sospecha que tiene o se sabe que tiene CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón en el que los niveles o funciones de OGTA025 se aumentan con respecto a un control o a un intervalo de referencia. En ejemplos adicionales, los compuestos que disminuyen el nivel o función de OGTA025 se administran terapéutica o profilácticamente a un sujeto que se sospecha que tiene o se sabe que tiene CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón en el que los niveles o funciones de OGTA025 se disminuyen con respecto a un control o a un intervalo de referencia. El cambio en la función o nivel de OGTA025 debido a la administración de tales compuestos puede ser fácilmente detectado, por ejemplo, mediante la obtención de una muestra (por ejemplo, sangre u orina) y analizando *in vitro* los niveles o actividades de OGTA025, o los niveles de los ARNm que codifican OGTA025 o cualquier combinación de los anteriores. Tales ensayos se pueden realizar antes y después de la administración del compuesto como se describe en la presente memoria.

25 Los compuestos de la descripción incluyen, pero no se limitan a, cualquier compuesto, por ejemplo, una molécula orgánica pequeña, proteína, péptido, anticuerpo (u otro reactivo de afinidad tal como un Aficuerpo, Nanocuerpo o Unicuerpo), ácido nucleico, etc. Que restaura el perfil de OGTA025 hacia el normal. Los compuestos de la descripción pueden administrarse en combinación con cualquier otro fármaco de quimioterapia.

Terapia con vacunas

30 OGTA025 puede ser útil como material antigénico y se puede utilizar en la producción de vacunas para el tratamiento o profilaxis de CHC, glioblastoma y cáncer de pulmón. Tal material puede ser "antigénico" y/o "inmunogénico". Generalmente, se entiende por "antigénico" que la proteína es capaz de ser utilizada para producir anticuerpos (u otros reactivos de afinidad tales como Aficuerpos, Nanocuerpos o Unicuerpos) o, de hecho, es capaz de inducir una respuesta de anticuerpos en un sujeto o animal experimental. Se entiende por "inmunogénico" que la proteína es capaz de provocar una respuesta inmune protectora en un sujeto o animal experimental. De este modo, en el último caso, la proteína puede ser capaz no sólo de generar una respuesta de anticuerpos sino, además, respuestas inmunes no basadas en anticuerpos. El término "inmunogénico" también abarca ya sea que la proteína puede provocar una respuesta de tipo inmune en un ensayo *in vitro*, por ejemplo, un ensayo de proliferación de células T.

40 El experto en la materia apreciará que los homólogos o derivados de OGTA025 también encuentran uso como material antigénico/inmunogénico. Así, por ejemplo, las proteínas que incluyen una o más adiciones, supresiones, sustituciones o similares están abarcadas por la presente descripción. Además, puede ser posible sustituir un aminoácido por otro de "tipo" similar, por ejemplo, sustituyendo un aminoácido hidrófobo por otro. Se puede utilizar un programa tal como el programa CLUSTAL para comparar las secuencias de aminoácidos. Este programa compara las secuencias de aminoácidos y encuentra la alineación óptima mediante la inserción de espacios en cualquier secuencia según sea apropiado. Es posible calcular la identidad o similitud de los aminoácidos (identidad más conservación del tipo de aminoácido) para una alineación óptima. Un programa como BLASTx alineará el tramo más largo de secuencias similares y asignará un valor al ajuste. De este modo es posible obtener una comparación en la que se encuentran varias regiones de similitud, cada una con una puntuación diferente. Ambos tipos de análisis se contemplan en la presente descripción.

50 En el caso de homólogos y derivados, el grado de identidad con una proteína como se describe en la presente memoria es menos importante que el homólogo o derivado deba conservar su antigenicidad y/o inmunogenicidad. Sin embargo, convenientemente, se proporcionan homólogos o derivados que tienen al menos 60% de similitud (como se discutió anteriormente) con las proteínas o polipéptidos descritos en la presente memoria. Preferiblemente, se proporcionan homólogos o derivados que tienen al menos 70% de similitud, más preferiblemente al menos 80% de similitud. Más preferiblemente, se proporcionan homólogos o derivados que tienen al menos 90% o incluso 95% de similitud.

55 En un enfoque alternativo, los homólogos o derivados podrían ser proteínas de fusión, incorporando fracciones que facilitan la purificación, por ejemplo, marcando eficazmente la proteína o polipéptido deseado. Puede ser necesario eliminar la "etiqueta" o puede ser el caso de que la proteína de fusión misma retenga antigenicidad suficiente para ser útil.

- Es bien conocido que es posible cribar una proteína o polipéptido antigénico para identificar regiones epitópicas, es decir, aquellas regiones que son responsables de la antigenicidad o inmunogenicidad de la proteína o polipéptido. Pueden usarse métodos bien conocidos por el experto en la técnica para probar fragmentos y/o homólogos y/o derivados por antigenicidad. Por lo tanto, los fragmentos de la presente descripción deberían incluir una o más de dichas regiones epitópicas o ser suficientemente similares a dichas regiones para retener sus propiedades antigénicas/inmunogénicas. Por lo tanto, para los fragmentos de acuerdo con la presente descripción, el grado de identidad es quizás irrelevante, ya que pueden ser 100% idénticos a una parte particular de una proteína o polipéptido, homólogo o derivado como se describe en la presente memoria. La cuestión clave, una vez más, es que el fragmento retenga las propiedades antigénicas/inmunogénicas de la proteína de la que se deriva.
- Lo que es importante para homólogos, derivados y fragmentos es que poseen al menos un grado de la antigenicidad/inmunogenicidad de la proteína o polipéptido del cual se derivan. De este modo, se proporcionan fragmentos antigénicos/o inmunogénicos de OGTA025, o de homólogos o derivados de los mismos.
- OGTA025, o fragmentos antigénicos del mismo, se pueden proporcionar solos, como una preparación purificada o aislada. Pueden proporcionarse como parte de una mezcla con una o más proteínas, o fragmentos antigénicos de los mismos. También se proporciona una composición antigénica que comprende OGTA025 y/o uno o más de sus fragmentos antigénicos. Dicha composición puede usarse para la detección y/o diagnóstico de CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón.
- En un ejemplo adicional se proporciona un método para detectar y/o diagnosticar CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón que comprende:
- poner en contacto con una muestra a ensayar un OGTA025 antigénico, o un fragmento antigénico del mismo, o una composición antigénica de la descripción; y
- detectar la presencia de anticuerpos (u otros reactivos de afinidad tales como Aficuerpos, Nanocuerpos o Unicuerpos) para CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón.
- En particular, la proteína, el fragmento antigénico de la misma o la composición antigénica de la presente descripción se pueden usar para detectar anticuerpos IgA, IgM o IgG. Adecuadamente, la muestra a ensayar será una muestra biológica, por ejemplo, una muestra de sangre o saliva.
- En un ejemplo adicional se proporciona el uso de un OGTA025 antigénico, fragmento antigénico del mismo o una composición antigénica de la presente descripción para detectar y/o diagnosticar CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón. Preferiblemente, la detección y/o diagnóstico se llevan a cabo *in vitro*.
- El OGTA025 antigénico, sus fragmentos antigénicos o la composición antigénica de la presente descripción puede proporcionarse como un kit para uso en la detección y/o diagnóstico *in vitro* de CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón. Por lo tanto, en otro ejemplo más, se proporciona un kit para su uso en la detección y/o diagnóstico de CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón, kit que comprende un OGTA025 antigénico, un fragmento antigénico del mismo o una composición antigénica de la presente descripción.
- Además, el OGTA025 antigénico, su fragmento antigénico o la composición antigénica de la descripción pueden usarse para inducir una respuesta inmune contra CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón. De este modo, en otro ejemplo adicional, se proporciona el uso de un OGTA025 antigénico, un fragmento antigénico del mismo o una composición antigénica de la descripción en medicina.
- En un ejemplo adicional, se proporciona una composición capaz de provocar una respuesta inmune en un sujeto, cuya composición comprende OGTA025, un fragmento antigénico del mismo, o una composición antigénica de la descripción. Adecuadamente, la composición será una composición de vacuna, que opcionalmente comprende uno o más adyuvantes adecuados. Dicha composición de vacuna puede ser una composición de vacuna profiláctica o terapéutica.
- Las composiciones de vacuna de la descripción pueden incluir uno o más adyuvantes. Ejemplos bien conocidos en la técnica incluyen geles inorgánicos, tales como hidróxido de aluminio, y emulsiones de agua en aceite, tales como adyuvante incompleto de Freund. Otros adyuvantes útiles serán bien conocidos por el experto en la materia.
- En aún otro ejemplo, se proporciona:
- (a) el uso de OGTA025, un fragmento antigénico del mismo, o una composición antigénica de la descripción en la preparación de una composición inmunogénica, preferiblemente una vacuna;
- (b) el uso de tal composición inmunogénica en la inducción de una respuesta inmune en un sujeto; y
- (c) un método para el tratamiento o profilaxis de CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón en un sujeto, o para la vacunación de un sujeto contra CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de OGTA025, al menos un fragmento antigénico del mismo o una composición antigénica de la descripción, preferiblemente como una vacuna.

En un ejemplo específico, se utiliza una preparación de OGTA025 o fragmentos peptídicos de OGTA025 como vacuna para el tratamiento de CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón. Dichas preparaciones pueden incluir adyuvantes u otros vehículos.

5 En otro ejemplo, se usa una preparación de oligonucleótidos que comprende 10 o más nucleótidos consecutivos complementarios a una secuencia de nucleótidos que codifica OGTA025 o fragmentos de péptidos de OGTA025 como vacunas para el tratamiento de CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón. Dichas preparaciones pueden incluir adyuvantes u otros vehículos.

Inhibición de OGTA025 para tratar CHC, glioblastoma y cáncer de pulmón

10 En un ejemplo de la descripción, se tratan o previenen el CHC, el glioblastoma o el cáncer de pulmón mediante la administración de un compuesto que antagoniza (inhibe) el nivel o niveles y/o función o funciones de OGTA025 que se elevan en el suero o tejido de sujetos que tienen CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón en comparación con el suero o tejido de sujetos libres de CHC, glioblastoma y cáncer de pulmón.

15 Los compuestos útiles para este propósito incluyen, pero no se limitan a anticuerpos anti-OGTA025 (u otros reactivos de afinidad tales como Aficuerpos, Nanocuerpos o Unicuerpos, y fragmentos y derivados que contienen la región de unión de los mismos), OGTA025 antisentido o ácidos nucleicos de ribozima y ácidos nucleicos que codifican OGTA025 disfuncional que se usan para "desactivar" la función de OGTA025 endógena mediante recombinación homóloga (véase, por ejemplo, Capecchi, 1989, Science 244: 1288-1292). Otros compuestos que inhiben la función de OGTA025 se pueden identificar mediante el uso de ensayos *in vitro* conocidos, por ejemplo, ensayos para la capacidad de un compuesto de prueba para inhibir la unión de OGTA025 a otra proteína o un compañero de unión, o para inhibir una función conocida de OGTA025. Preferiblemente, dicha inhibición se ensaya *in vitro* o en cultivo celular, pero también se pueden emplear ensayos genéticos. La tecnología preferida también se puede usar para detectar niveles de OGTA025 antes y después de la administración del compuesto. Preferiblemente, se utilizan ensayos *in vitro* o *in vivo* adecuados para determinar el efecto de un compuesto específico y si su administración es indicada para el tratamiento del tejido afectado, como se describe con más detalle a continuación.

25 En un ejemplo específico, se administra un compuesto que inhibe la función de OGTA025 terapéutica o profilácticamente a un sujeto en el que se detecta un aumento en el suero o nivel en el tejido o actividad funcional de OGTA025 (por ejemplo, mayor que el nivel normal o el nivel deseado) en comparación con suero o tejido de sujetos libres de CHC, glioblastoma y cáncer de pulmón o un intervalo de referencia predeterminado. Pueden emplearse métodos estándar en la técnica para medir el aumento en el nivel o función de OGTA025, como se ha indicado anteriormente. Las composiciones inhibitorias preferidas de OGTA025 incluyen moléculas pequeñas, es decir, moléculas de 1000 Dalton o menos. Tales moléculas pequeñas pueden ser identificadas mediante métodos de cribado descritos en la presente memoria.

Ensayos para compuestos terapéuticos o profilácticos

35 La presente descripción también proporciona ensayos para uso en el descubrimiento de fármacos con el fin de identificar o verificar la eficacia de compuestos para el tratamiento o la prevención de CHC, glioblastoma y cáncer de pulmón. Los compuestos de ensayo pueden probarse en cuanto a su capacidad para restablecer los niveles de OGTA025 en un sujeto que tiene CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón hacia niveles hallados en sujetos libres de CHC, glioblastoma y cáncer de pulmón o para producir cambios similares en modelos animales experimentales de CHC, glioblastoma o pulmón cáncer. Los compuestos capaces de restablecer los niveles de OGTA025 en un sujeto que tiene CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón hacia niveles encontrados en sujetos libres de CHC, glioblastoma y cáncer de pulmón o para producir cambios similares en modelos animales experimentales de CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón se pueden usar como compuestos guía para el descubrimiento adicional de fármacos, o usos terapéuticos. La expresión de OGTA025 puede ensayarse mediante la tecnología preferida, inmunoensayos, electroforesis en gel seguido por visualización, detección de actividad de OGTA025, o cualquier otro método descrito en la presente memoria o conocido por los expertos en la técnica. Tales ensayos pueden usarse para cribar los fármacos candidatos, en el control clínico o en el desarrollo de fármacos, en donde la abundancia de OGTA025 puede servir como marcador sustituto para la enfermedad clínica.

45 En diversos ejemplos específicos, pueden realizarse ensayos *in vitro* con células representativas de tipos celulares implicados en el trastorno de un sujeto, para determinar si un compuesto tiene un efecto deseado sobre tales tipos de células.

50 Los compuestos para uso en terapia pueden analizarse en sistemas adecuados de modelos animales antes de ensayar en seres humanos, incluyendo, pero no limitándose a ratas, ratones, pollos, vacas, monos, conejos, etc. Para el análisis *in vivo*, antes de la administración a seres humanos, se puede usar cualquier sistema de modelo animal conocido en la técnica. Ejemplos de modelos animales de CHC, glioblastoma y cáncer de pulmón incluyen, pero no se limitan a, xenoinjertos de líneas celulares de CHC tales como MHCC97 en ratones desnudos (Tian et al., Br J Cancer 1999 Nov.; 81 (5): 814-21); xenoinjertos de líneas celulares de glioblastoma tales como U87MG en ratones desnudos (Abernathey et al., Neurosurgery 1988 Mayo; 22 (5): 877-81) o xenoinjertos de líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas tales como A549 y H460 y xenoinjertos de líneas celulares de cáncer de pulmón de células pequeñas tales

como NCI-H345 o NCI-H69. Estas pueden utilizarse para probar compuestos que modulan los niveles de OGTA025, ya que la patología exhibida en estos modelos es similar a aquella de CHC, glioblastoma y cáncer de pulmón. También es evidente para el experto en la técnica que, con base en la presente descripción, se pueden producir animales transgénicos con mutaciones "desactivadas" del gen o genes que codifican OGTA025. Una mutación "desactivada" de un gen es una mutación que causa que el gen mutado no se exprese, o se exprese en una forma aberrante o en un nivel bajo, de tal manera que la actividad asociada con el producto génico esté casi o completamente ausente. Preferiblemente, el animal transgénico es un mamífero; más preferiblemente, el animal transgénico es un ratón.

En un ejemplo, los compuestos de ensayo que modulan la expresión de OGTA025 se identifican en animales no humanos (por ejemplo, ratones, ratas, monos, conejos y conejillos de indias), preferiblemente modelos animales no humanos para CHC, glioblastoma y cáncer de pulmón, que expresan OGTA025. De acuerdo con este ejemplo, se administra un compuesto de prueba o un compuesto de control a los animales, y se determina el efecto del compuesto de prueba sobre la expresión de OGTA025. Un compuesto de prueba que altera la expresión de OGTA025 puede ser identificado comparando el nivel de OGTA025 (o ARNm que codifica el mismo) en un animal o grupo de animales tratados con un compuesto de prueba con el nivel de OGTA025 o ARNm en un animal o grupo de animales tratados con un compuesto de control. Las técnicas conocidas por los expertos en el arte pueden usarse para determinar los niveles de ARNm y proteína, por ejemplo, en hibridación *in situ*. Los animales pueden o no ser sacrificados para ensayar los efectos de un compuesto de prueba.

En otro ejemplo, se identifican compuestos de ensayo que modulan la actividad de OGTA025 o una parte biológicamente activa de los mismos en animales no humanos (por ejemplo, ratones, ratas, monos, conejos y conejillos de indias), preferiblemente modelos animales no humanos para CHC, glioblastoma y cáncer de pulmón, que expresan OGTA025. De acuerdo con este ejemplo, se administra un compuesto de prueba o un compuesto de control a los animales, y se determina el efecto de un compuesto de prueba sobre la actividad de OGTA025. Se puede identificar un compuesto de prueba que altera la actividad de OGTA025 ensayando animales tratados con un compuesto de control y animales tratados con el compuesto de prueba. La actividad de OGTA025 se puede evaluar detectando la inducción de un segundo mensajero celular de OGTA025 (por ejemplo, Ca^{2+} intracelular, diacilglicerol, IP3, etc.), detectando la actividad catalítica o enzimática de OGTA025 o su compañero de unión, detectando la inducción de un gen informador (por ejemplo, un elemento regulador que responde a OGTA025 operativamente enlazado a un ácido nucleico que codifica un marcador detectable, tal como luciferasa o proteína fluorescente verde), o detectar una respuesta celular (por ejemplo, diferenciación celular o proliferación celular). Pueden utilizarse técnicas conocidas por los expertos en el arte para detectar cambios en la actividad de OGTA025 (véase, por ejemplo, la patente estadounidense No. 5.401.639).

En otro ejemplo más, se identifican compuestos de ensayo que modulan el nivel o la expresión de OGTA025 en sujetos humanos que tienen CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón, preferiblemente aquellos que tienen CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón severos. De acuerdo con este ejemplo, se administra un compuesto de prueba o un compuesto de control al sujeto humano y se determina el efecto de un compuesto de prueba sobre la expresión de OGTA025 analizando la expresión de OGTA025 o el ARNm que codifica el mismo en una muestra biológica (por ejemplo, suero, plasma u orina). Un compuesto de prueba que altera la expresión de OGTA025 se puede identificar comparando el nivel de OGTA025 o ARNm que codifica el mismo en un sujeto o grupo de sujetos tratados con un compuesto de control con aquel en un sujeto o grupo de sujetos tratados con un compuesto de prueba. Alternativamente, las alteraciones en la expresión de OGTA025 se pueden identificar comparando el nivel de OGTA025 o ARNm que codifica el mismo en un sujeto o grupo de sujetos antes y después de la administración de un compuesto de prueba. Se pueden usar técnicas conocidas por los expertos en el arte para obtener la muestra biológica y analizar la expresión de ARNm o proteína. Por ejemplo, la tecnología preferida descrita en el presente documento puede usarse para evaluar cambios en el nivel de OGTA025.

En otro ejemplo, se identifican compuestos de ensayo que modulan la actividad de OGTA025 en sujetos humanos que tienen CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón, (preferiblemente aquellos con CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón severos). En este ejemplo, se administra un compuesto de prueba o un compuesto de control al sujeto humano, y se determina el efecto de un compuesto de prueba sobre la actividad de OGTA025. Un compuesto de prueba que altera la actividad de OGTA025 se puede identificar comparando muestras biológicas de sujetos tratados con un compuesto de control con muestras de sujetos tratados con el compuesto de prueba. Alternativamente, las alteraciones en la actividad de OGTA025 se pueden identificar comparando la actividad de OGTA025 en un sujeto o grupo de sujetos antes y después de la administración de un compuesto de prueba. La actividad de OGTA025 se puede evaluar detectando en una muestra biológica (por ejemplo, suero, plasma u orina) la inducción de una ruta de transducción de señal celular de OGTA025 (por ejemplo, Ca^{2+} intracelular, diacilglicerol, IP3, etc.), actividad catalítica o enzimática de OGTA025 o un compañero de unión del mismo, o una respuesta celular, por ejemplo, diferenciación celular o proliferación celular. Las técnicas conocidas por los expertos en el arte se pueden usar para detectar cambios en la inducción de un segundo mensajero de OGTA025 o cambios en una respuesta celular. Por ejemplo, se puede usar RT-PCR para detectar cambios en la inducción de un segundo mensajero celular.

En un ejemplo preferido, se selecciona un compuesto de prueba que cambia el nivel o la expresión de OGTA025 hacia niveles detectados en sujetos de control (por ejemplo, humanos libres de CHC, glioblastoma y cáncer de pulmón) para su posterior ensayo o uso terapéutico. En otro ejemplo preferido, se selecciona un compuesto de prueba que cambia la actividad de OGTA025 hacia la actividad encontrada en sujetos de control (por ejemplo, seres humanos libres de CHC, glioblastoma y cáncer de pulmón) para su posterior análisis o uso terapéutico.

En otro ejemplo, se identifican compuestos de ensayo que reducen la gravedad de uno o más síntomas asociados con CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón en sujetos humanos que tienen CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón, preferiblemente sujetos con CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón severos. De acuerdo con este ejemplo, se administra un compuesto de prueba o un compuesto de control a los sujetos, y se determina el efecto de un compuesto de prueba sobre uno o más síntomas de CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón. Se puede identificar un compuesto de prueba que reduce uno o más síntomas comparando los sujetos tratados con un compuesto de control con los sujetos tratados con el compuesto de prueba. Se pueden usar técnicas conocidas por médicos familiarizados con CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón para determinar si un compuesto de prueba reduce uno o más síntomas asociados con CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón. Por ejemplo, un compuesto de prueba que reduce la carga tumoral en un sujeto que tiene CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón será beneficioso para sujetos que tienen CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón.

En un ejemplo preferido, se selecciona un compuesto de prueba que reduce la gravedad de uno o más síntomas asociados con CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón en un ser humano que tiene CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón para su posterior ensayo o uso terapéutico.

15 Composiciones terapéuticas y profilácticas y su uso

La descripción proporciona métodos de tratamiento (y profilaxis) que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de la descripción. En un aspecto preferido, el compuesto se purifica sustancialmente (por ejemplo, sustancialmente exento de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios no deseados). El sujeto es preferiblemente un animal, incluyendo, pero no limitado a animales tales como vacas, cerdos, caballos, pollos, gatos, perros, etc., y es preferiblemente un mamífero, y lo más preferiblemente humano. En una realización específica, el sujeto es un mamífero no humano.

Las formulaciones y métodos de administración que pueden emplearse cuando el compuesto comprende un ácido nucleico se describieron anteriormente; a continuación, se describen formulaciones y vías de administración adicionales apropiadas.

Se conocen varios sistemas de suministro y se pueden usar para administrar un compuesto de la descripción, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por el receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, 1987, *J. Biol. Chem.* 262: 4429-4432), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro tipo de vector, etc. Los métodos de introducción pueden ser enterales o parenterales e incluyen, pero no se limitan a intradérmicos, intramusculares, Intraperitoneal, intravenosos, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Los compuestos se pueden administrar por cualquier ruta conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir las composiciones farmacéuticas de la descripción en el sistema nervioso central por cualquier ruta adecuada, incluyendo inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede ser facilitada por un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito de Ommaya. La administración pulmonar también puede emplearse, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente que forma aerosol.

En un ejemplo específico, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la descripción localmente a la zona que necesita tratamiento; esto puede lograrse, por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, por inyección, por medio de un catéter, o por medio de un implante, siendo dicho implante de material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibrosas. En un ejemplo, la administración puede ser por inyección directa en el hígado, glioblastoma o tejido pulmonar o en el sitio (o sitio anterior) de un tumor maligno o tejido neoplásico o preneoplásico.

En otra realización, el compuesto se puede suministrar en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, 1990, *Science* 249: 1527-1533, Treat et al., en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, López-Berestein y Fidler (eds.), Liss, New York, páginas 353-365 (1989), López-Berestein, recién citado, páginas 317-327, véase en general la cita anterior)

En otra realización adicional, el compuesto se puede suministrar en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede usar una bomba (véase, Langer, citado anteriormente; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed Eng.* 14: 201, Buchwald et al., 1980, *Surgery* 88: 507, Saudek et al., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321: 574). En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos (véase, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Ratón, Florida (1974), *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J., 1983, *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23: 61; véase también Levy et al., 1985, *Science* 228: 190; During et al., 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard et al., 1989, *J. Neurosurg.* 71:105). En otra realización adicional, se puede colocar un sistema de liberación controlada en cercanías del objetivo terapéutica, es decir, el hígado, cerebro o pulmón, requiriendo así sólo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, citado más arriba, volumen 2, páginas 115-138 (1984)).

Otros sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión de Langer (1990, Science 249: 1527-1533).

En un ejemplo específico en el que el compuesto de la descripción es un ácido nucleico que codifica una proteína, el ácido nucleico se puede administrar *in vivo* para promover la expresión de su proteína codificada, construyéndola como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándola para que se vuelva intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral (véase la patente estadounidense No. 4.980.286), o mediante inyección directa, o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola de genes, Biolistic, Dupont) o recubrimiento con lípidos o receptores de la superficie celular o agentes transfectantes, o administrándolo en unión a un péptido tipo homeobox que se sabe que ingresa al núcleo (véase, por ejemplo, Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. 88: 1864-1868), etc. Alternativamente, se puede introducir un ácido nucleico en forma intracelular y se incorpora en el ADN de la célula huésped para su expresión, mediante recombinación homóloga.

La presente divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas. Dichas composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En un ejemplo específico, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por un organismo regulador del gobierno federal o estatal o enlistado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de petróleo, origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra en forma intravenosa. Soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también pueden emplearse como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada seca, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes reguladores de pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, pastillas, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores estándar tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma de administración apropiada al sujeto. La formulación debe adaptarse al modo de administración.

En un ejemplo preferido, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en regulador acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición puede incluir también un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran por separado o se mezclan juntos en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en forma de polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente tal como una ampolla o bolsita que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se va a administrar por infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua o solución salina estéril grado farmacéutico. Cuando la composición se administra mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua o solución salina estéril para inyección de manera que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

Los compuestos de la descripción se pueden formular como formas neutras o de sales. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con grupos amino libres tales como los derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y aquellas formadas con grupos carboxilo libres tales como los derivados de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, hierro, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

La cantidad del compuesto de la descripción que será eficaz en el tratamiento de CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. Además, se pueden emplear opcionalmente ensayos *in vitro* para ayudar a identificar intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa a emplear en la formulación también dependerá de la vía de administración y de la gravedad de la enfermedad o trastorno y debe decidirse de acuerdo con el juicio del médico y las circunstancias de cada sujeto. Sin embargo, los intervalos de dosificación adecuados para la administración intravenosa son generalmente de aproximadamente 20-500 microgramos de compuesto activo por kilogramo de peso corporal. Los intervalos adecuados de dosis para administración intranasal son generalmente de aproximadamente 0,01 pg/kg de peso corporal hasta 1 mg/kg de peso corporal. Las dosis eficaces pueden extrapolarse a partir de curvas de respuesta a la dosis derivada de sistemas de ensayo de modelo animal o *in vitro*.

Los supositorios generalmente contienen ingrediente activo en el intervalo de 0,5% a 10% en peso; las formulaciones orales contienen preferiblemente de 10% a 95% de ingrediente activo.

La descripción también proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes rellenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la descripción. Opcionalmente asociado con

dicho contenedor o contenedores puede estar una información en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, cuya información refleja (a) la aprobación por la agencia de fabricación, uso o venta para administración humana, (b) las instrucciones de uso, o ambas.

5 Determinación de la abundancia de OGTA025 mediante tecnología de formación de imágenes

Una ventaja de determinar la abundancia de OGTA025 por tecnología de formación de imágenes puede ser que dicho método sea no invasivo (con la salvedad de que es necesario administrar los reactivos) y no hay necesidad de extraer una muestra del sujeto.

10 Las tecnologías adecuadas de formación de imágenes incluyen tomografía de emisión de positrones (PET) y tomografía computarizada de emisión de fotones individuales (SPECT). La visualización de OGTA025 usando tales técnicas requiere la incorporación o unión de un marcador adecuado, por ejemplo, un trazador radioactivo, tal como ¹⁸F, ¹¹C o ¹²³I (véase, por ejemplo, NeuroRx- The Journal of American Society for Experimental NeuroTherapeutics 2005) 2 (2), 348-360 y las páginas citadas anteriormente 361-371 para más detalles de las técnicas). Los trazadores radioactivos u otros marcadores pueden ser incorporados en OGTA025 mediante la administración al sujeto (por ejemplo, mediante inyección) de un ligando específico marcado adecuadamente. Alternativamente, se pueden incorporar en un reactivo de afinidad de unión (anticuerpo, Aficuerpo, Nanocuerpo, Unicuerpo, etc.) específico para OGTA025 que se puede administrar al sujeto (por ejemplo, mediante inyección). Para la discusión del uso de Aficuerpos para la obtención de imágenes véase, por ejemplo, Orlova A, Magnusson M, Eriksson TL, Nilsson M, Larsson B, Hoiden-Guthenberg I, Widstrom C, Carlsson J, Tolmachev V, Stahl S, Nilsson FY, Tumor imaging using a picomolar affinity HER2 binding affibody molecule, Cancer Res. 2006 abril 15; 66(8): 4339-48.

20 Diagnóstico y tratamiento de CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón mediante Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica es una excelente técnica de detección y puede por lo tanto ser muy útil en el diagnóstico y tratamiento de CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón. La inmunohistoquímica puede usarse para detectar, diagnosticar o controlar CHC, glioblastoma o cáncer de pulmón a través de la localización de antígenos OGTA025 en secciones de tejido mediante el uso de anticuerpos marcados (u otros reactivos de afinidad tales como Aficuerpos, Nanocuerpos o Unicuerpos), derivados y análogos de los mismos, que específicamente se unen a OGTA025, como reactivos específicos a través de interacciones antígeno-anticuerpo que se visualizan mediante un marcador tal como colorante fluorescente, enzima, elemento radiactivo u oro coloidal.

30 El avance de la tecnología de anticuerpos monoclonales ha sido de gran importancia para garantizar el lugar de la inmunohistoquímica en el diagnóstico microscópico preciso moderno de neoplasias humanas. La identificación de células transformadas diseminadas en forma neoplásica por inmunohistoquímica permite una imagen más clara de la invasión y metástasis del cáncer, así como la evolución del inmunofenotipo asociado a células tumorales hacia una mayor malignidad. Los futuros enfoques terapéuticos antineoplásicos pueden incluir una variedad de inmunoterapias individualizadas, específicas para el patrón inmunofenotípico particular asociado con cada enfermedad neoplásica de cada paciente individual. Para una discusión adicional véase, por ejemplo, Bodey B, The significance of immunohistochemistry in the diagnosis and therapy of neoplasms, Expert Opin Biol Ther. 2002 abril; 2 (4): 371-93.

35 Ejemplo 1: identificación de proteínas de membrana expresadas en muestras de sangre y tejido de CHC y glioblastoma usando electroforesis en gel unidimensional

40 Utilizando el siguiente protocolo de referencia, se separaron las proteínas de membrana extraídas de muestras de tejido de CHC y glioblastoma mediante gel unidimensional y se analizaron.

1.1 Materiales y métodos

1.1.1 - Fraccionamiento de la membrana plasmática

45 Las células recuperadas de un glioblastoma o del epitelio de un carcinoma hepatocelular se lisaron y se sometieron a centrifugación a 1000 x g. El sobrenadante se extrajo, y posteriormente se centrifugó a 3000 x g. Una vez más, se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 100.000 x g.

El precipitado resultante se recuperó y se colocó en un gradiente de sacarosa al 15-60%.

Se usó una transferencia Western para identificar marcadores subcelulares, y se combinaron las fracciones de la membrana plasmática.

50 La solución combinada se aplicó ya sea directamente sobre geles unidimensionales (véase la sección 1.1.4 más adelante), o se fraccionó adicionalmente en fracciones de unión a heparina y de unión a nucleótidos como se describe a continuación.

1.1.2 - Fracción de la membrana plasmática que se une a heparina

La solución combinada de 1.1.1 anterior se aplicó a una columna de heparina, se eluyó de la columna y se aplicó en geles unidimensionales (véase la sección 1.1.4 más adelante).

1.1.3 - Fracción de plasma que se une a nucleótidos

5 La solución combinada de 1.1.1 anterior se aplicó a una columna Cibacrom Blue 3GA, se eluyó de la columna y se aplicó en geles unidimensionales (véase la sección 1.1.4 a continuación).

1.1.4 - Tecnología de gel unidimensional

Los precipitados de proteína o de membrana se solubilizaron en regulador de muestra unidimensional (1-2 µg/µL). El regulador de muestra y la mezcla de proteínas se calentó luego a 95°C durante 3 min.

10 Se moldeó un gel de gradiente de acrilamida al 9-16% con un gel de apilamiento y un peine de apilamiento según el procedimiento descrito en Ausubel F.M. Et al., Eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. II, Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, sección 10.2.

Se añadieron 30-50 microgramos de las mezclas de proteína obtenidas a partir del detergente y los estándares de peso molecular (66, 45, 31, 21, 14 kDa) a los pozos del gel de apilamiento usando una punta de pipeta de 10 microlitros y se corrieron las muestras a 40mA durante 5 horas.

15 A continuación, las placas se abrieron, el gel se colocó en una bandeja con fijador (10% de ácido acético 40%, de etanol, 50% de agua) y se agitó durante la noche. Después de esto, se fijó el gel durante 30 minutos agitando en una solución de fijación (de ácido acético al 7,5%, (75 mL), SDS al 0,05% (5 mL de 10%)). El gel se incubó a continuación con un colorante fluorescente (ácido acético al 7,5%, colorante interno OGS al 0,06% (600 µL) con agitación durante 3 horas. El colorante Sypro Red (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregón) es un colorante adecuado para este propósito.
20 Un colorante fluorescente preferido se describe en la solicitud de patente estadounidense No. 09/412.168, presentada el 5 de octubre de 1999.

25 Se produjo una salida legible por ordenador mediante formación de imágenes de los geles teñidos mediante fluorescencia con un escáner Apollo 3 (Oxford Glycoscience, Oxford, RU). Este escáner se desarrolla a partir del escáner descrito en el documento WO 96/36882 y en Tesis doctoral de David A. Basiji, titulada "Development of a High-throughput Fluorescence Scanner Employing Internal Reflection Optics and Phase-sensitive Detection (Total Internal Reflection, Electrophoresis)", Universidad de Washington (1997), Volumen 58/12-B de Dissertation Abstracts International, página 6.686. La última realización de este instrumento incluye las siguientes mejoras: el gel se transporta a través del escáner en un sistema de precisión de accionamiento de tornillo sin fin. Para esto es preferible colocar la placa de vidrio en el sistema accionado por correa que se define en la tesis de Basiji ya que proporciona un medio reproducible de transporte preciso del gel más allá de la óptica de formación de imágenes.
30

El gel se asegura en el escáner contra tres topes de alineación que sujetan rígidamente la placa de vidrio en una posición conocida. Haciendo esto junto con el sistema de transporte de precisión anterior y el hecho de que el gel está unido a la placa de vidrio, se puede predecir y registrar la posición absoluta del gel. Esto asegura que las coordenadas exactas de cada característica en el gel se pueden comunicar al robot de corte para la escisión. Este robot de corte tiene una disposición de montaje idéntica para la placa de vidrio para preservar la precisión de la posición.
35

El soporte que sostiene el gel en su lugar tiene marcadores fluorescentes integrales (denominados M1, M2, M3) que se usan para corregir la geometría de la imagen y son una característica de control de calidad para confirmar que el escaneado se ha realizado correctamente.

40 Los componentes ópticos del sistema han sido invertidos. El láser, el espejo, la guía de ondas y otros componentes ópticos están ahora sobre la placa de vidrio que se está escaneando. La realización de la tesis de Basiji tiene estos componentes por debajo. La placa de vidrio se monta por lo tanto en forma invertida en el gel del escáner, de manera que la trayectoria óptica permanece a través de la placa de vidrio. Al hacer esto, cualquiera de las partículas de gel que pueda separarse de la placa de vidrio caerá sobre la base del instrumento en lugar de en la óptica.

45 En el escaneo de los geles, se removieron de la mancha, se enjuagaron con agua y se dejó secar al aire brevemente y se tomaron las imágenes con el Apollo 3. Después de la formación de las imágenes se sellaron los geles en bolsas de polietileno que contienen un pequeño volumen de solución de tinción, y después se almacenaron a 4°C.

Se calcularon los pesos moleculares aparentes mediante interpolación de un conjunto de marcadores de peso molecular conocido que corrieron al lado de las muestras.

1.1.5 - Recuperación y análisis de las proteínas seleccionadas

50 Se cortaron en forma automática las proteínas de los geles mediante el proceso descrito en la patente estadounidense No. 6.064.754, secciones 5.4 y 5.6, 5.7, 5.8, como es aplicable a electroforesis unidimensional, con modificación para el cortador robótico de la siguiente manera: el cortador comienza en la parte superior del carril, y corta un disco de gel de 1,7 mm de diámetro desde el borde izquierdo del carril. El cortador se mueve entonces 2 mm hacia la derecha y 0,7 mm hacia abajo y corta un disco adicional. Esto se repite entonces. El cortador se desplaza entonces de nuevo a una

posición directamente debajo del primer corte de gel, pero compensado por 2,2 mm hacia abajo, y se repite el patrón de tres cortes diagonales. Esto se continúa durante toda la longitud del gel.

5 NOTA: Si se observa que el carril se ensancha significativamente, entonces se puede hacer una corrección también en dirección lateral. Es decir, en lugar de volver a una posición directamente debajo de un corte de gel previo, el corte se puede desplazar ligeramente hacia la izquierda (a la izquierda del carril) y/o hacia la derecha (a la derecha del carril). Las proteínas contenidas en los fragmentos de gel se procesaron para generar péptidos tripticos; las secuencias de aminoácidos parciales de estos péptidos se determinaron mediante espectroscopia de masas como se describe en el documento WO 98/53323 y en la solicitud número 09/094.996, presentada el 15 de junio de 1998.

10 Las proteínas se procesaron para generar péptidos de digestión triptica. Los péptidos tripticos se analizaron mediante espectrometría de masas usando un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo de ionización/desorción con láser asistido por matriz (MALDI-TOF) PerSeptive Biosystems Voyager-DETM STR, y se analizaron los péptidos tripticos seleccionados mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS) usando un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo de cuadrupolo (Q-TOF) (Micromass, Altrincham, RU) equipado con una fuente de aspersion Z de electroaspersion de nanoflujo (MR). Para la secuenciación e identificación parcial de aminoácidos de OGTA025, se buscaron espectros de masa en tándem no interpretados de péptidos tripticos usando el programa de búsqueda SEQUEST (Eng et al., 1994, J. Am. Soc. Mass Spectrom., 5: 976-989), versión v.C.1. Los criterios para la identificación de la base de datos incluyeron: la especificidad de escisión de la tripsina; la detección de una serie de iones a, b y y en péptidos retornados de la base de datos, y un incremento de masa para todos los residuos de Cys para dar cuenta de la carbamidometilación. La base de datos buscada fue una base de datos construida de entradas de proteínas en la base de datos no redundante del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI), que puede consultarse en www.ncbi.nlm.nih.gov. Después de la identificación de las proteínas a través de la correlación espectral-espectral utilizando el programa SEQUEST, se asignaron las masas detectadas en los espectros de masas MALDI-TOF a los péptidos tripticos digeridos dentro de las proteínas identificadas. En los casos en los que no se pudo identificar secuencias de aminoácidos mediante la búsqueda con espectros MS/MS no interpretados de péptidos tripticos digeridos usando el programa SEQUEST, los espectros de masas en tándem de los péptidos se interpretaron manualmente, utilizando métodos conocidos en la técnica. (En el caso de la interpretación de espectros de masa de fragmentación de baja energía de iones peptídicos, véase Gaskell et al., 1992, Rapid Commun. Mass Spectrom., 6: 658-662).

1.1.6 - Discriminación de las proteínas asociadas a CHC y glioblastoma

30 El proceso para identificar OGTA025 utiliza las secuencias peptídicas obtenidas experimentalmente por espectrometría de masas descritas anteriormente de proteínas humanas naturales para identificar y organizar exones codificantes en la secuencia publicada del genoma humano.

35 Los avances dramáticos recientes en la definición de la secuencia química del genoma humano han llevado a la casi finalización de esta inmensa tarea (Venter, JC et al., (2001), The sequence of the human genome Science 16: 1304-51; International Human Genome Sequencing Consortium (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome Nature 409: 860-921). No hay duda de que esta secuencia de información tendrá un impacto sustancial en nuestra comprensión de muchos procesos biológicos, incluyendo la evolución molecular, la genómica comparativa, los mecanismos patógenos y la medicina molecular. Para que el valor médico completo inherente a la secuencia del genoma humano se realice, el genoma necesita ser "organizado" y anotado. Con esto, se entienden al menos las siguientes tres cosas: (i) el montaje de las secuencias de las porciones individuales del genoma en una secuencia coherente y continua para cada cromosoma. (ii) La identificación inequívoca de aquellas regiones de cada cromosoma que contienen genes. (iii) Determinación de la estructura fina de los genes y las propiedades de su ARNm y productos proteicos. Si bien la definición de un 'gen' es una cuestión cada vez más compleja (H Pearson: What is a gene? Nature (2006) 24: 399-401), lo que es de interés inmediato para el descubrimiento y el desarrollo de fármacos, es un catálogo de aquellos genes que codifican proteínas funcionales expresadas. Un subconjunto de estos genes estará involucrado en la base molecular de la mayoría sino de todas las patologías. Por lo tanto, un objetivo importante e inmediato para la industria farmacéutica es identificar todos esos genes en el genoma humano y describir su estructura fina.

Procesamiento e integración de masas de péptidos, firmas de péptidos, EST y datos de secuencias genómicas de dominio público para formar la base de datos OGAP®

50 Se identificaron unidades genéticas discretas (exones, transcriptos y genes) usando las siguientes etapas secuenciales:

1. Se genera un 'transcriptoma virtual' que contiene los péptidos tripticos que trazan el mapa del genoma humano mediante la combinación de las identificaciones de los genes disponibles a través de Ensembl y diversos programas de predicción génica. Esto también incorpora datos SNP (de dbSNP) y todo el empalme alternativo de identificaciones de genes. También se añadieron contaminantes conocidos al transcriptoma virtual.

55 2. Todos los espectros en tándem en la base de datos de espectrometría de masas OGeS se interpretan con el fin de producir un péptido que puede ser mapeado hasta un transcriptoma virtual. Se utilizó un conjunto de algoritmos automatizados de interpretación espectral para producir las identificaciones de los péptidos.

3. El conjunto de todos los péptidos de la misma masa en la base de datos de espectrometría de masas OGeS se generó mediante la búsqueda de todos los péptidos de los transcritos alcanzados por los péptidos en tándem usando una tolerancia con base en la precisión de masa del espectrómetro de masas, típicamente 20 ppm.

4. Todos los péptidos en tándem y que coincidieron en masa se combinan en la forma de "agrupaciones de proteínas". Esto se hace usando un proceso recursivo que agrupa secuencias en grupos con base en aciertos comunes de péptidos. Se considera que las secuencias biológicas pertenecen al mismo grupo si comparten uno o más péptidos en tándem o de la misma masa.

5. Después del filtrado inicial para cribar los péptidos identificados en forma incorrecta, se mapean luego las agrupaciones resultantes en el genoma humano.

6. Los grupos de proteínas se agregan luego en regiones que definen límites de genes preliminares usando su proximidad y la observación conjunta de péptidos dentro de grupos de proteínas. La proximidad se define como el péptido que está dentro de 80.000 nucleótidos en la misma hebra del mismo cromosoma. Varias reglas de eliminación, con base en la observación de grupos de puntuación y mapeo múltiple con el genoma se utilizan para refinar la salida. Los 'genes confirmados' resultantes son aquellos que mejor explican los péptidos y masas observadas por espectrometría de masas en cada grupo. Las coordenadas nominales para el gen son también una salida de esta etapa.

7. El mejor conjunto de transcritos para cada gen confirmado se crean a partir de los grupos de proteínas, péptidos, EST, exones candidatos y peso molecular de la mancha original de proteína.

8. Cada transcrito identificado se unió a la muestra proporcionando los péptidos observados.

9. Uso de una aplicación para observación y minería de los datos. El resultado de las etapas 1-8 fue una base de datos que contenía genes, cada uno de los cuales consistía en una serie de exones y uno o más transcritos. Se escribió una aplicación para mostrar y buscar estos datos del genoma/proteoma integrados. Cualquiera de las características (locus de la enfermedad OMIM, InterPro etc.) que habían sido mapeadas con el mismo sistema de coordenadas Golden Path mediante Ensembl podrían ser referenciadas en forma cruzada con estos genes por la coincidencia de localización y estructura fina.

Resultados

El proceso se utilizó para generar aproximadamente 1 millón de secuencias de péptidos para identificar genes que codifican proteínas y sus exones que dieron como resultado la identificación de secuencias de proteínas para 18.083 genes a través de 67 tejidos diferentes y 57 enfermedades incluyendo 506 genes en cáncer de vejiga, 4.713 genes en cáncer de mama, 766 genes en el linfoma de Burkitt, 1.371 genes en cáncer cervical, 949 genes en cáncer colorrectal, 1.544 genes en glioblastoma, 1.782 genes en carcinoma hepatocelular, 2.424 genes en CLL, 978 genes en cáncer de pulmón, 1.764 genes en melanoma, 1.033 genes en cáncer de ovario, 2.961 genes en cáncer de páncreas y 3.307 genes en cáncer de próstata, ilustrado aquí mediante OGTA025 aislado e identificado a partir de muestras de CHC y glioblastoma. Después de la comparación de las secuencias determinadas experimentalmente con secuencias en la base de datos OGAP®, OGTA025 mostró un alto grado de especificidad para CHC y glioblastoma indicativa del pronóstico y naturaleza del diagnóstico.

1.2 Resultados

Estos experimentos identificaron OGTA025, en sus dos isoformas diferentes, como se describe adicionalmente en la presente memoria. El OGTA025 de longitud completa se detectó en la membrana plasmática de muestras de CHC y glioblastoma y no se detectó en el citosol.

La Figura 2 muestra el índice de proteínas para OGTA025. Para cada gen, el índice de proteínas utiliza los datos de espectrometría de masas para asignar una puntuación a cada enfermedad, en relación con la base de datos global. El índice de proteína puede utilizarse para identificar genes específicos del cáncer con una puntuación alta en las indicaciones de cáncer y puntuaciones bajas/insignificantes en las enfermedades normales y otras. El índice contiene ~ 1 millón de péptidos secuenciados a través de espectrometría de masas de 56 enfermedades. Para cada gen, esto produce una puntuación para cada enfermedad y localización subcelular. Los resultados se resumen a continuación:

Informe del índice de proteínas para OGTA025

Indicaciones positivas:

Carcinoma hepatocelular

Glioblastoma

Cancer de próstata

Control de enfermedades

Leucemia monocítica aguda	Diabetes y obesidad	Esclerosis múltiple
Leucemia aguda de células T	Diverticulitis	Neuroblastoma
Enfermedad de Alzheimer	Dislipidemia	Normal
Artritis	Enfisema	Obesidad
Asma	Metaplasia apocrina focal	Osteoartritis
Ateroesclerosis	Cáncer gástrico	Osteosarcoma
Linfoma no Hodgkin de células B	Enfermedad de Gaucher	Cáncer de ovario
Carcinoma de vejiga	Glioblastoma	Cáncer de páncreas
Cáncer de mama	Hepatoblastoma	Cáncer de próstata
Enfermedades de la mama, benignas	Carcinoma hepatocelular	Enfermedades prostáticas, benignas
Linfoma de Burkitt	Hipertensión	Prostatitis
Bursitis	Focos de lactancia	Cáncer de células renales
Cáncer, no especificado	Leucemia, no especificada	Retinoblastoma
Cáncer de cuello uterino	Cirrosis hepática	Esquizofrenia
Leucemia linfocítica crónica	Cáncer de pulmón	Úlcera cutánea
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	Linfoma histiocítico	Tabaquismo
Cáncer colorrectal	Melanoma	Teratocarcinoma
Demencia, vascular	síndrome metabólico X	
Depresión	Migraña, aguda	

Localización subcelular

Gránulos de Birbeck	Membrana de hipocampo	Membrana plasmática
Digestión de la superficie celular	Membrana	Segregada
Membrana de la corteza celular	Fracción de unión a la glicoproteína de la membrana	Fracción Soluble
Membrana de meninges Cerebrales	Mitocondria	Sobrenadante
Fracción de cromatina	Núcleo	Célula completa
Membrana celular cruda	Membrana nerviosa periférica	
Citosol	Peroxisomas	
Golgi/Mitocondrial	Membrana pituitaria	

5 La Figura 2 muestra que el índice de proteínas para OGTA025 es alto en la membrana plasmática de carcinoma hepatocelular y medio en membrana plasmática de glioblastoma. También se detectó bajo en la membrana de la corteza cerebral normal, bajo en la membrana de meninges cerebrales normales, bajo en la membrana o del hipocampo normal, bajo en la membrana nerviosa periférica normal, bajo en la membrana pituitaria normal y bajo en el sobrenadante de cáncer de próstata. OGTA025 no se detectó en ninguna otra enfermedad. Esto indica que OGTA025 es potencialmente un buen marcador para el carcinoma hepatocelular y el glioblastoma.

10 Ejemplo 2: Identificación de proteínas de membrana expresadas en muestras de sangre y de tejido de cáncer de pulmón utilizando etiquetado de isótopos para cuantificación absoluta y relativa (iTRAQ)

Usando el siguiente protocolo de referencia, se digirieron proteínas de membrana extraídas de tejido de cáncer de pulmón y muestras normales de tejido pulmonar adyacente, marcadas con etiquetado de isótopos para reactivos de cuantificación absoluta y relativa (iTRAQ; Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU. y se secuenciaron los péptidos resultantes por espectrometría de masas en tándem.

5 2.1 Materiales y métodos

2.1.1 - Fraccionamiento de membranas plasmáticas

Las células recuperadas de un cáncer de pulmón o del tejido adyacente normal se lisaron y se sometieron a centrifugación a 1000 x g. El sobrenadante se extrajo, y posteriormente se centrifugó a 3000 x g. Una vez más, se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 100.000 x g.

10 El precipitado resultante se recuperó y se puso en un gradiente de sacarosa al 15-60%.

Se usó una transferencia de Western para identificar marcadores subcelulares, y se agruparon las fracciones de la membrana plasmática.

La solución combinada se analizó directamente por iTRAQ (véase la sección 2.1.2 a continuación).

2.1.2 - Metodología iTRAQ

15 Se solubilizaron los precipitados de proteína de la membrana procedentes de cáncer colorrectal y del tejido adyacente normal en regulador de muestra (2-4 µg/µL en SDS al 0,5%) mediante la adición de regulador y luego calentamiento a 95°C durante 3 min.

20 A un volumen de cada solución de proteína equivalente a 50 µg, se le añadieron 150 µL de solución de bicarbonato de trietilamonio 0,5 M (TEAB). A cada muestra, se le añadieron 3 µL de tris-(2-carboxietil) fosfina 50 mM y la mezcla se incubó a 60°C durante 1 hora. A continuación, se añadió 1 µL de reactivo de bloqueo de cisteína, metanotiosulfonato de metilo (MMTS) 200 mM en isopropanol. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 10 minutos, se añadieron 15 µL de tripsina de 1 µg/µL a cada muestra, seguido de incubación a 37°C durante una noche.

25 Las muestras digeridas se secaron al vacío y se reconstituyeron con 30 µL de solución de TEAB 0,5 M. Se añadieron 70 µL de etanol a cada uno de los cuatro reactivos de iTRAQ (114/115/116/117) y se añadió un reactivo a cada una de las cuatro muestras analizadas (dos muestras de cáncer de pulmón y dos muestras correspondientes de tejido adyacente normal) y se dejaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Se registró el reactivo específico añadido a cada muestra. Las cuatro muestras marcadas se combinaron y se sometieron a agitación tipo vórtice.

30 La muestra combinada se redujo hasta sequedad al vacío y se desalinizó mediante carga en una columna de centrifuga C18, lavando con disolvente acuoso y después eluyendo con acetonitrilo al 70%. La fracción de muestra se redujo de nuevo a sequedad y después se volvió a disolver en 40 µL de disolvente A (97,9% de agua, 2% de acetonitrilo, 0,1% de ácido fórmico) antes del fraccionamiento por intercambio iónico.

2.1.3 - Fraccionamiento y análisis de péptidos marcados

35 La muestra se fraccionó mediante cromatografía de intercambio catiónico fuerte usando un cromatógrafo Agilent 1200 (Agilent, Santa Clara, CA, EE.UU.). Las muestras se eluyeron de una columna Agilent Zorbax Bio-SCXII (3,5 µm, 50 x 0,8 mm) usando un gradiente de 20 µL/min de acetato de sodio 0-100 mM durante 20 minutos y luego a 1 M durante 10 minutos. Se recogieron las fracciones de 1 minuto durante los 30 minutos de duración.

40 Cada fracción se analizó mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas usando un cromatógrafo Agilent 1200 equipado con un instrumento de Zorbax 300SB-C18 (150 mm x 75 µm) y un instrumento de tiempo de vuelo de cuadrupolo Agilent 6510 (Agilent, Santa Clara, CA, EE.UU.). Los péptidos se eluyeron con un gradiente de 300 nL/min aumentando de 15% a 45% de acetonitrilo en 60 minutos. Los datos se adquirieron en modo automático MS/MS de modo que se seleccionaron hasta 3 iones precursores por encima del umbral de intensidad y se acumularon espectros de iones producto para facilitar la secuenciación de los péptidos marcados. Los datos crudos se procesaron para crear listas de picos utilizando el software Spectrum Mill (Agilent, Santa Clara, CA, EE.UU.).

2.1.4 - Análisis de la secuencia de aminoácidos de péptidos marcados

45 Para la secuenciación parcial de aminoácidos e identificación de OGTA025, se buscaron los espectros de masa en tándem no interpretados de péptidos trípticos mediante el programa de búsqueda SEQUEST (Eng et al., 1994, J. Am. Soc. Mass Spectrom., 5: 976-989). Los criterios para la identificación de la base de datos incluyeron: la especificidad de la escisión de la tripsina; la detección de una serie de iones a, b y y en péptidos devueltos de la base de datos, y un incremento de masa para todos los residuos de cisteína para explicar la modificación con metil metanotiosulfonato y la adición de etiquetas iTRAQ a aminas libres (N-terminal y lisina). Los datos fueron buscados a través de IPI Human v3.23 (www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhuman.html).

2.1.5 - Discriminación de las proteínas asociadas al cáncer de pulmón

El proceso descrito en el Ejemplo 1 sección 1.1.6 se empleó para discriminar las proteínas asociadas al cáncer de pulmón en las muestras experimentales.

2.2 Resultados

5 Estos experimentos identificaron OGTA025, en sus dos isoformas diferentes, como se describe adicionalmente en la presente memoria. El OGTA025 de longitud completa se detectó en la membrana plasmática de muestras de cáncer de pulmón. El análisis de iTRAQ mostró que los niveles de OGTA025 en las muestras de cáncer de pulmón fueron mayores que en las muestras de tejido adyacentes normales coincidentes.

La Figura 2 muestra el índice de proteínas para OGTA025. Véase el Ejemplo 1, sección 1.2, para una descripción del índice de proteínas para OGTA025.

10 Ejemplo 3: Cribado para la expresión del ARNm usando reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR)

Utilizando del siguiente protocolo de referencia, se cribaron diversos tejidos normales y cancerosos para la expresión de ARNm de OGTA025 usando reacción en cadena de polimerasa de transcriptasa inversa cuantitativa (RT-PCR).

3.1 Materiales y métodos

15 Para RT-PCR cuantitativa, se usaron los cebadores de OGTA025 siguientes: IGSF4.3: CTCTTTGCTGCTGCCCATGTTTCA (SEQ ID NO: 10); IGSF4.4: AAACCTTTCTGGACAGCGTAGGGT (SEQ ID NO: 11) como los proporcionados por Operon Biotechnologies (Huntsville, AL). Se usaron condiciones de reacción estándar (5 µL de plantilla de ADNc a razón de 1 ng/µL, 0,1 µL de cebador en dirección 5' 40 µM, 0,1 µL de cebador en dirección 3' 40 µM, 6 µL de mezcla 2X SYBR Green PCR (Applied Biosystems # 4367659) y 0,8 µL de agua). El ADNc se amplificó durante 40 ciclos usando condiciones de PCR estándar en un ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA).

3.2 Resultados

25 La Figura 3 muestra los resultados de RT-PCR para OGTA025 para una variedad de tejidos normales y cancerosos. El eje vertical muestra la copia #/5 ng de ADNc de OGTA025. Este gráfico indica una alta expresión de ARNm de OGTA025 en cáncer de pulmón, en particular cáncer de pulmón de células pequeñas. La expresión de ARNm es indicativa de la expresión de la proteína OGTA025.

Ejemplo 4: Generación de anticuerpos para OGTA025

Usando el siguiente protocolo de referencia, se generó la porción ECD de OGTA025 como una proteína recombinante y se usó para inmunización y generación de anticuerpos contra OGTA025.

4.1 Materiales y métodos

30 La porción ECD de OGTA025 se generó como una proteína recombinante fusionada a una etiqueta de 6 His en células CHO-S.

35 Se utilizó la línea celular de mieloma Sp2/0 (ATCC CRL 1581) para las fusiones. El vial ATCC original se descongeló y se expandió en cultivo. Se preparó un stock de semillas de viales congelados a partir de esta expansión. Las células se mantuvieron en cultivo durante 1 mes, se pasaron dos veces por semana. Se usó sobrenadante de células P388D1 (ATCC, TIB-63 FL) como medio acondicionado para los hibridomas. Brevemente, se cultivaron las células y se expandieron a 200 mL. Se cultivaron los cultivos estacionarios durante ~7 días. El sobrenadante agotado se centrifugó y se filtró a través de un filtro estéril de 0,2 µm. Esta línea celular se pasó durante 1 mes y luego un nuevo vial descongelado y cultivado.

40 Los anticuerpos generados procedían de fusiones de células Sp2/0 con linfocitos extraídos del bazo/ganglios linfáticos de ratones (Hco27, Hco7 (JK) y KM) inmunizados con la proteína rhOGTA025-ECD-his a una dosis de 5-25 µg en el adyuvante Ribi por una pata (intervalos de 3-5 días) o en forma ip/sc en intervalos de 2-4 semanas para un total de 5-8 inmunizaciones. La secuencia OGTA025 usada para la inmunización se muestra en la Figura 4 (SEQ ID No: 3). Esta secuencia incluye la secuencia señal sintética para la secreción.

4.2 Resultados

45 Se generaron varios anticuerpos de OGTA025 a partir del protocolo anterior incluyendo 1C7, 2G7 y 6G11.

Ejemplo 5: Cribado de anticuerpos antihigiénicos humanos específicos usando el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)

Usando el siguiente protocolo de referencia, se determinó la especificidad de los anticuerpos generados en el Ejemplo 4 mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

5.1 Materiales y métodos

- 5 La placa se recubrió durante la noche con rhOGTA025-ECD-his (o una proteína rh-his irrelevante) 1-2 µg/mL en 1XPBS, 50 µL/pozo. Se guardó en el refrigerador. La placa se vació y se bloqueó en 1XPBST + 5% de suero de pollo durante 30 minutos a 1 hora a temperatura ambiente (200 µL/pozo). La placa se vació y se lavó manualmente con una botella de lavado (3x) o una lavadora de placas 1XPBST. Si se usaba una botella de lavado, se drenaron las placas sobre toallas de papel.
- 10 Se añadieron 50 µL/pozo de regulador de bloqueo a la placa y luego se añadieron 50 µL/pozo de sobrenadante de hibridoma. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se utilizó un control positivo cuando estaba disponible. La placa se vació y se lavó manualmente con una botella de lavado (3x) o lavadora de placas (3x) usando 1XPBST. Si se usaba una botella de lavado, se drenaron las placas sobre toallas de papel.
- 15 Se diluyó la Fc de IgG antihumano HRP (1:3000) o κ antihumana HRP (1:2000) secundaria, en 1XPBST + 5% de suero de pollo. Se añadieron 100 µL/pozo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Se vació la placa y se lavó manualmente con una botella de lavado (3x) o lavadora de placas (3x) usando 1XPBST. Si se usó una botella de lavado, se drenaron las placas sobre toallas de papel.
- Se desarrolló la placa utilizando 10 mL de sustrato ABTS. Se incubó durante 15-30 minutos a temperatura ambiente. La placa se leyó con el software Molecular Devices (415-490 nM).

Reactivos y equipo:

- Solución salina regulada de fosfato (PBS), DPBS sin Ca y Mg (Hyclone SH30013.03 o Sigma P 3813).
- PBS-T (regulador de lavado), PBS que contenía Tween 20® al 0,05% (Sigma P-1379).
- 20 PBS-T más BSA al 1% (Sigma A 9647) o suero de pollo al 5%. Esto sirve como regulador de bloqueo y regulador de muestra.
- Placas de ELISA (Nunc, Imuno-plate F96 Maxisorp 442404 o Falcon, placas flexibles 353912 o placas Costar EIA/RIA, fondo plano de 96 pozos, # 9018).
- rhOGTA025-ECD-his y una proteína rh-his irrelevante.
- 25 anticuerpo específico de cadena g antihumana HRP (Jackson, 109-036-098), k antihumano HRP (Bethyl, A80-115P).
- Sustrato ABTS (Moss Inc, producto: ABTS-1000).
- Lector de placas ELISA con filtro de 405 nm.
- Lavadora automatizada de placa ELISA.

5.2 Resultados

- 30 Los resultados mostraron que los anticuerpos generados en el Ejemplo 4 son altamente específicos para OGTA025.
- Ejemplo 6: Cribado de anticuerpos humanos utilizando clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS)
- Utilizando el siguiente protocolo de referencia, se cribaron los anticuerpos de OGTA025 generados en el Ejemplo 4 sobre células de cáncer de pulmón NCI-H69 usando clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

6.1 Materiales y métodos

- 35 Las células se prepararon contando las células NCI-H69 y calculando la viabilidad para la línea celular. Se transfirieron suficientes células para una muestra de $0,25 \times 10^5$ /muestra a un tubo de 50 mL y se lavaron dos veces con PBS.
- 40 Las células se resuspendieron en regulador FACS frío (FBS al 2% en PBS con azida al 0,02%) a razón de $2,5 \times 10^5$ células/mL. Se añadieron 100 µL/pozo a una placa de 96 pozos de fondo en U (Falcon Non-Tissue Culture Treated # 35-1177) y se centrifugaron a 2500 RPM durante 1 minuto. El regulador se descartó en un solo movimiento rápido y la placa se palmeó suavemente sobre toallas de papel para eliminar el exceso de regulador.
- Se añadieron 100 µL de muestras de sobrenadantes y controles a los pozos y se resuspendieron los sedimentos. Se incubó durante 30-40 minutos sobre hielo. A continuación, se lavó una vez con 200 µL/pozo del regulador FACS y se centrifugó a 2500 RPM a 4°C durante 1 minuto. El regulador se desechó.
- 45 Se añadieron 50 µL/pozo de Fc secundario específico de IgG antihumana de cabra marcado con FITC (Jackson, # 109-095-098) a una dilución de 1:100. Se incubó durante 20-30 minutos a 4°C en la oscuridad y luego se lavó dos veces con 200 µL/pozo del regulador FACS y se centrifugó a 2500 RPM a 4°C durante 1 minuto.

Las muestras se resuspendieron en 80 µL/pozo de regulador de FACS que contenía yoduro de propidio (Roche, Cat. 1 348 639) diluido 1:100. La placa de 96 pozos se leyó directamente en FACSCalibur. Los datos se analizaron utilizando el software CellQuest.

Reactivos de FACS:

- 5 Regulador de FACS: Solución salina regulada con fosfato (PBS) más FBS al 2% (Hyclone, # SH30071.03) y 0,02% de NaN₃ (Sigma # S-8032). Esto sirvió como regulador de bloqueo, así como regulador de lavado.

Placas de ELISA (Becton Dickinson, Falcon, placa de 96 pozos con fondo en U, # 351177).

Tubos de FACS (Becton Dickinson, Falcon, No. 352052).

Anticuerpo específico de cadena y antihumano marcado con FITC (Jackson, # 109-095-098).

- 10 Yoduro de propidio (Roche # 1348639)

FACSCalibur (Becton Dickinson)

Centrífuga Eppendorf (Eppendorf # 581012)

6.2 Resultados

- 15 La Figura 5 muestra un gráfico del análisis de FACS con las muestras y controles sobre el eje horizontal y la media geométrica de la intensidad de fluorescencia en el eje vertical. Este gráfico muestra que existen muy buenos anticuerpos contra OGTA025 que se unen bien a las células de cáncer de pulmón NCI-H69. Los ejemplos de tales anticuerpos son 1C7, 2G7 y 6G11.

Ejemplo 7: Inmunohistoquímica utilizando anticuerpos de OGTA025

- 20 Usando el siguiente protocolo de referencia, se realizó la inmunohistoquímica en tejidos normales y tejidos tumorales FDA congelados usando los anticuerpos OGTA025 generados en el Ejemplo 4.

7.1 Materiales y métodos

7.1.1 - Fijación de láminas portaobjetos

- 25 Se tomaron láminas portaobjetos del congelador de -80°C y se colocaron en una bandeja (con toalla de papel) en una cabina de flujo laminar para descongelar durante 30 minutos. Las láminas portaobjetos descongeladas se colocaron en acetona (Sigma Cat # 154598-1L) durante 5 minutos. Las láminas portaobjetos se colocaron a continuación en 1XPBS durante 1 minuto.

7.1.2 - Preparación del complejo de anticuerpos primarios

- 30 Se diluyeron los anticuerpos primarios de OGTA025 (2G7 y 6G11) usando un bloque de proteínas libre de suero (Dako X0909). La concentración final fue de 100 µg/mL. Se diluyó el Fab FITC de IgG antihumano de cabra (Jackson # 109-097-003); La concentración final fue de 200 µg/mL (40 µL 200 µL de bloque de proteína libre de suero). Se mezclaron cantidades calculadas de IgG primaria y humana y se incubó durante 1-2 minutos y después se añadió el diluyente (Bloque de proteína libre de suero). Luego se incubó durante otros 30 minutos.

7.1.3 - Bloqueo de las láminas portaobjetos con peroxidasa

- 35 Se colocaron un par de gotas de bloqueador de peroxidasa (Dako S2001) para cubrir cada sección de las láminas portaobjetos. Se incubaron las láminas portaobjetos a temperatura ambiente durante 5 minutos.

7.1.3 - Bloqueo

Las láminas portaobjetos se enjuagaron con solución de PBS-Tween20® desde una botella con atomizador. Las láminas portaobjetos se sumergieron a continuación en PBS. Cada sección se cubrió con bloque de proteína libre de suero y se incubó durante 30 minutos.

- 40 Se añadió un volumen de bloqueador después de la formación del complejo de gammaglobulina al 1% (Jackson # 009-000-003) al complejo de anticuerpos y se incubó durante 30 minutos.

7.1.4 - Unión de anticuerpos

- 45 Se eliminó el agente bloqueador y se añadió complejo de anticuerpo primario para cubrir cada sección (~100 µL). Se colocó el cubre objetos sobre la sección y se incubó durante 45 minutos. Se enjuagaron las láminas portaobjetos con solución de PBS-Tween20® de una botella con atomizador y se lavaron en 3 baños de PBS x 4 minutos.

Se añadió el anticuerpo secundario (1:100 de anti-FITC de ratón o anti-FITC de conejo, dependiendo del tejido). Se colocó el cubreobjetos sobre la sección y se incubó durante 20 minutos. Las láminas portaobjetos se enjuagaron con solución de PBS-Tween20® de una botella con atomizador y se lavaron en 3 baños de PBS x 4 minutos.

5 Se añadió la HRP marcada con polímero (Dako K4063/K4002, ya sea de ratón/conejo o solo de conejo, dependiendo del tejido). Se colocó el cubreobjetos sobre la sección y se incubó durante 20 minutos. Las láminas portaobjetos se lavaron con solución PBS-Tween20® de una botella con atomizador y se lavaron en 2 baños de PBS x 4 minutos.

10 Se añadió el cromógeno del sustrato AEC (Dako K3464) y se incubó durante un máximo de 10 minutos mientras se observaba el cambio de color. Se enjuagó con dH₂O en una solución blanqueadora al 10%. Se añadieron un par de gotas de hematoxilina a la sección de cubierta y se incubó durante 2 minutos. A continuación, se enjuagó con H₂O, se secó y se montó.

7.2 Resultados

Se cribó el antígeno OGTA025 a través de 30 tejidos normales por triplicado (3 donantes separados por tejido) - estos tejidos se enlistan a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3 - Conjunto de tejidos normales de la FDA

Suprarrenal
Cerebro, Cerebelo
Cerebro, Cerebrum
Cerebro, pituitaria
Seno
Colon
Esófago
Corazón
Riñón
Hígado
Pulmón
Músculo esquelético
Mesotelio pericárdico
Nervios periféricos
Ovario
Páncreas
Placenta
Próstata
Glándula salival
Piel
Intestino delgado
Bazo
Estómago
Testículo
Timo

Tiroides
Amígdala
Útero
Útero, cuello uterino
Médula ósea

5 La inmunohistoquímica utilizando los anticuerpos 2G7 y 6G11 de OGTA025 en estos tejidos normales no mostró coloración en el cerebro o los nervios periféricos, tinción mínima en el páncreas y las suprarrenales (<50% de las células) y fuerte tinción en la glándula salival y los testículos. Esto confirma que la expresión de OGTA025 está altamente restringida en tejidos normales de un adulto humano.

10 La inmunohistoquímica utilizando anticuerpos 2G7 y 6G11 de OGTA025 en una variedad de tejidos tumorales demostró fuerte tinción de células tumorales en muestras de cáncer de cerebro y fuerte tinción en una gran mayoría de células tumorales en 5/7 muestras de cáncer de pulmón de células pequeñas. Esto es consistente con la hipótesis de que los anticuerpos dirigidos a OGTA025 pueden usarse para dirigir células cancerosas de cáncer de cerebro y cáncer de pulmón en un entorno terapéutico.

Todas las referencias mencionadas en esta solicitud incluyendo las patentes y las solicitudes de patente se incorporan aquí por referencia de la manera más completa posible.

15 A lo largo de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto lo exija de otro modo, se entenderá que la palabra 'comprende' y variaciones tales como 'que comprende' se entenderá que implican la inclusión de un número entero establecido, etapa, Grupo de números enteros o grupo de etapas, pero no la exclusión de cualquier otro número entero, etapa, grupo de números enteros o grupo de etapas.

Listado de secuencias

<110> Oxford Genome Sciences Rohlf, Christian

<120> PROTEÍNA

20 <130> OGL-P121PCT

<160> 11

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 443

25 <212> PRT

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> Característica nueva

<222> (1)..(443)

30 <223> SwisProt: Q8N2F4; Q8BY67; Ensembl: ENSG00000182985 IGSF4 (isoforma 1)

<400> 1

ES 2 625 259 T3

Met Ala Ser Val Val Leu Pro Ser Gly Ser Gln Cys Ala Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Ala Ala Ala Ala Pro Pro Gly Leu Arg Leu Arg Leu Leu Leu Leu Leu
 20 25 30
 Phe Ser Ala Ala Ala Leu Ile Pro Thr Gly Asp Gly Gln Asn Leu Phe
 35 40 45
 Thr Lys Asp Val Thr Val Ile Glu Gly Glu Val Ala Thr Ile Ser Cys
 50 55 60
 Gln Val Asn Lys Ser Asp Asp Ser Val Ile Gln Leu Leu Asn Pro Asn
 65 70 75 80
 Arg Gln Thr Ile Tyr Phe Arg Asp Phe Arg Pro Leu Lys Asp Ser Arg
 85 90 95
 Phe Gln Leu Leu Asn Phe Ser Ser Ser Glu Leu Lys Val Ser Leu Thr
 100 105 110
 Asn Val Ser Ile Ser Asp Glu Gly Arg Tyr Phe Cys Gln Leu Tyr Thr
 115 120 125
 Asp Pro Pro Gln Glu Ser Tyr Thr Thr Ile Thr Val Leu Val Pro Pro
 130 135 140
 Arg Asn Leu Met Ile Asp Ile Gln Lys Asp Thr Ala Val Glu Gly Glu
 145 150 155 160
 Glu Ile Glu Val Asn Cys Thr Ala Met Ala Ser Lys Pro Ala Thr Thr
 165 170 175

ES 2 625 259 T3

Ile Arg Trp Phe Lys Gly Asn Thr Gu Leu Lys Gly Lys Ser Gu Val
 180 185 190
 Gu Gu Trp Ser Asp Met Tyr Thr Val Thr Ser Gn Leu Met Leu Lys
 195 200 205
 Val His Lys Gu Asp Asp Gly Val Pro Val Ile Cys Gn Val Gu His
 210 215 220
 Pro Ala Val Thr Gly Asn Leu Gn Thr Gn Arg Tyr Leu Gu Val Gn
 225 230 235 240
 Tyr Lys Pro Gn Val His Ile Gn Met Thr Tyr Pro Leu Gn Gly Leu
 245 250 255
 Thr Arg Gu Gly Asp Ala Leu Gu Leu Thr Cys Gu Ala Ile Gly Lys
 260 265 270
 Pro Gn Pro Val Met Val Thr Trp Val Arg Val Asp Asp Gu Met Pro
 275 280 285
 Gn His Ala Val Leu Ser Gly Pro Asn Leu Phe Ile Asn Asn Leu Asn
 290 295 300
 Lys Thr Asp Asn Gly Thr Tyr Arg Cys Gu Ala Ser Asn Ile Val Gly
 305 310 315 320
 Lys Ala His Ser Asp Tyr Met Leu Tyr Val Tyr Asp Thr Thr Ala Thr
 325 330 335
 Thr Gu Pro Ala Val His Gly Leu Thr Gn Leu Pro Asn Ser Ala Gu
 340 345 350
 Gu Leu Asp Ser Gu Asp Leu Ser Asp Ser Arg Ala Gly Gu Gu Gly
 355 360 365
 Ser Ile Arg Ala Val Asp His Ala Val Ile Gly Gly Val Val Ala Val
 370 375 380
 Val Val Phe Ala Met Leu Cys Leu Leu Ile Ile Leu Gly Arg Tyr Phe
 385 390 395 400
 Ala Arg His Lys Gly Thr Tyr Phe Thr His Gu Ala Lys Gly Ala Asp
 405 410 415
 Asp Ala Ala Asp Ala Asp Thr Ala Ile Ile Asn Ala Gu Gly Gly Gn
 420 425 430
 Asn Asn Ser Gu Gu Lys Lys Gu Tyr Phe Ile
 435 440

<210>2

<211> 442

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

5

<220>

<221> Característica nueva

<222> (1)..(442)

<223> SwissProt: Q8N2F4; Q9BY67; Ensembl: ENSG00000182985 IGSF4 (isoforma 2)

<400> 2

ES 2 625 259 T3

Met Ala Ser Val Val Leu Pro Ser Gly Ser Gln Cys Ala Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Ala Ala Ala Ala Pro Pro Gly Leu Arg Leu Arg Leu Leu Leu Leu Leu
 20 25 30
 Phe Ser Ala Ala Ala Leu Ile Pro Thr Gly Asp Gly Gln Asn Leu Phe
 35 40 45
 Thr Lys Asp Val Thr Val Ile Glu Gly Glu Val Ala Thr Ile Ser Cys
 50 55 60
 Gln Val Asn Lys Ser Asp Asp Ser Val Ile Gln Leu Leu Asn Pro Asn
 65 70 75 80
 Arg Gln Thr Ile Tyr Phe Arg Asp Phe Arg Pro Leu Lys Asp Ser Arg
 85 90 95
 Phe Gln Leu Leu Asn Phe Ser Ser Ser Glu Leu Lys Val Ser Leu Thr
 100 105 110
 Asn Val Ser Ile Ser Asp Glu Gly Arg Tyr Phe Cys Gln Leu Tyr Thr
 115 120 125
 Asp Pro Pro Gln Glu Ser Tyr Thr Thr Ile Thr Val Leu Val Pro Pro
 130 135 140
 Arg Asn Leu Met Ile Asp Ile Gln Arg Asp Thr Ala Val Glu Gly Glu
 145 150 155 160
 Glu Ile Glu Val Asn Cys Thr Ala Met Ala Ser Lys Pro Ala Thr Thr
 165 170 175
 Ile Arg Trp Phe Lys Gly Asn Thr Glu Leu Lys Gly Lys Ser Glu Val
 180 185 190
 Glu Glu Trp Ser Asp Met Tyr Thr Val Thr Ser Gln Leu Met Leu Lys
 195 200 205
 Val His Lys Glu Asp Asp Gly Val Pro Val Ile Cys Gln Val Glu His
 210 215 220

ES 2 625 259 T3

Pro Ala Val Thr Gly Asn Leu Gln Thr Gln Arg Tyr Leu Glu Val Gln
 225 230 235 240
 Tyr Lys Pro Gln Val His Ile Gln Met Thr Tyr Pro Leu Gln Gly Leu
 245 250 255
 Thr Arg Glu Gly Asp Ala Leu Glu Leu Thr Cys Glu Ala Ile Gly Lys
 260 265 270
 Pro Gln Pro Val Met Val Thr Trp Val Arg Val Asp Asp Glu Met Pro
 275 280 285
 Gln His Ala Val Leu Ser Gly Pro Asn Leu Phe Ile Asn Asn Leu Asn
 290 295 300
 Lys Thr Asp Asn Gly Thr Tyr Arg Cys Glu Ala Ser Asn Ile Val Gly
 305 310 315 320
 Lys Ala His Ser Asp Tyr Met Leu Tyr Val Tyr Asp Pro Pro Thr Thr
 325 330 335
 Ile Pro Pro Pro Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
 340 345 350 355
 Thr Ile Leu Thr Ile Ile Thr Asp Ser Arg Ala Gly Glu Glu Gly Ser
 360 365
 Ile Arg Ala Val Asp His Ala Val Ile Gly Gly Val Val Ala Val Val
 370 375 380
 Val Phe Ala Met Leu Cys Leu Leu Ile Ile Leu Gly Arg Tyr Phe Ala
 385 390 395 400
 Arg His Lys Gly Thr Tyr Phe Thr His Glu Ala Lys Gly Ala Asp Asp
 405 410 415
 Ala Ala Asp Ala Asp Thr Ala Ile Ile Asn Ala Glu Gly Gly Gln Asn
 420 425 430
 Asn Ser Glu Glu Lys Lys Glu Tyr Phe Ile
 435 440

<210> 3

<211> 326

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> proteína recombinante: porción de dominio extracelular de IGSF4 fusionada a una etiqueta 6-His

<400> 3

ES 2 625 259 T3

Met Arg Ala Trp Ile Phe Phe Leu Leu Cys Leu Ala Gly Arg Ala Leu
1 5 10 15

Thr Gln Asn Leu Phe Thr Lys Asp Val Thr Val Ile Gu Gly Gu Val
20 25 30

Ala Thr Ile Ser Cys Gln Val Asn Lys Ser Asp Asp Ser Val Ile Gln
35 40 45

Leu Leu Asn Pro Asn Arg Gln Thr Ile Tyr Phe Arg Asp Phe Arg Pro
50 55 60

Leu Lys Asp Ser Arg Phe Gln Leu Leu Asn Phe Ser Ser Ser Gu Leu
65 70 75 80

Lys Val Ser Leu Thr Asn Val Ser Ile Ser Asp Gu Gly Arg Tyr Phe
85 90 95

Cys Gln Leu Tyr Thr Asp Pro Pro Gln Gu Ser Tyr Thr Thr Ile Thr
100 105 110

Val Leu Val Pro Pro Arg Asn Leu Met Ile Asp Ile Gln Arg Asp Thr
115 120 125

Ala Val Gu Gly Gu Gu Ile Gu Val Asn Cys Thr Ala Met Ala Ser
130 135 140

Lys Pro Ala Thr Thr Ile Arg Trp Phe Lys Gly Asn Thr Gu Leu Lys
145 150 155 160

Gly Lys Ser Gu Val Gu Gu Trp Ser Asp Met Tyr Thr Val Thr Ser
165 170 175

Gln Leu Met Leu Lys Val His Lys Gu Asp Asp Gly Val Pro Val Ile
180 185 190

Cys Gln Val Gu His Pro Ala Val Thr Gly Asn Leu Gln Thr Gln Arg
195 200 205

Tyr Leu Gu Val Gln Tyr Lys Pro Gln Val His Ile Gln Met Thr Tyr
210 215 220

Pro Leu Gln Gly Leu Thr Arg Gu Gly Asp Ala Leu Gu Leu Thr Cys
225 230 235 240

Gu Ala Ile Gly Lys Pro Gln Pro Val Met Val Thr Trp Val Arg Val
245 250 255

Asp Asp Gu Met Pro Gln His Ala Val Leu Ser Gly Pro Asn Leu Phe
260 265 270

Ile Asn Asn Leu Asn Lys Thr Asp Asn Gly Thr Tyr Arg Cys Gu Ala

ES 2 625 259 T3

275 280 285

Ser Asn Ile Val Gly Lys Ala His Ser Asp Tyr Met Leu Tyr Val Tyr
290 295 300

Asp Ser Arg Ala Gly Gu Gu Gly Ser Ile Arg Ala Val Asp Ala Ser
305 310 315 320

His His His His His His
325

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

5 <213> Homo Sapiens

<400> 4

Ala Gly Gu Gu Gly Ser Ile Arg
1 5

<210> 5

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 5

Cys Gu Ala Ser Asn Ile Val Gly Lys
1 5

<210> 6

15 <211> 6

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 6

Asp Phe Arg Pro Leu Lys
1 5

20 <210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 7

Gly Thr Tyr Phe Thr His Gu Ala Lys
1 5

25 <210> 8

<211> 6

ES 2 625 259 T3

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 8

Gln Thr Ile Tyr Phe Arg
1 5

5 <210> 9

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 9

10

Ser Asp Asp Ser Val Ile Gln Leu Leu Asn Pro Asn Arg
1 5 10

<210> 10

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Cebador en dirección 5' para RT- PCR

<400> 10

ct ct t tgct g ct gcccat gt t tca 24

<210> 11

20

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador en dirección 3' para RT- PCR

25

<400> 11

aaacct t tct ggacagcgt a ggg 24

Reivindicaciones

1. Un anticuerpo o fragmento del mismo de unión al antígeno capaz de unión específica a IGSF4, conjugado con una fracción terapéutica para uso en el tratamiento o prevención de cáncer de pulmón de células pequeñas.

5

2. El anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno para uso de acuerdo con la reivindicación 1, que es un anticuerpo monoclonal.

3. El anticuerpo o un fragmento del mismo de unión al antígeno para uso según las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno se une al dominio extracelular de IGSF4.

4. El anticuerpo o fragmento del mismo de unión al antígeno para uso según la reivindicación 3, en donde el dominio extracelular de IGSF4 está definido por la SEQ ID NO: 3

10

Figura 1a

Fuente del péptido: 1D-GE, carcinoma hepatocelular

OGTA025a (SEQ ID No: 1)	MASVVLPSGSQCAAAAAAAAAAPPGLRLRLLLLLFSAAALIPTGDGQNLFTK	50
OGTA025b (SEQ ID No: 2)	MASVVLPSGSQCAAAAAAAAAAPPGLRLRLLLLLFSAAALIPTGDGQNLFTK	50

OGTA025a (SEQ ID No: 1)	DVTVIEGEVATISCQVNK <u>SDDSVIQLLNPNRQTIYFR</u> DFRPLKDSRFQLL	100
OGTA025b (SEQ ID No: 2)	DVTVIEGEVATISCQVNK <u>SDDSVIQLLNPNRQTIYFR</u> DFRPLKDSRFQLL	100

OGTA025a (SEQ ID No: 1)	NFSSSELKVSLTNVSI DEGRYFCQLYTDP PQESYTTITVLVPPRNLMID	150
OGTA025b (SEQ ID No: 2)	NFSSSELKVSLTNVSI DEGRYFCQLYTDP PQESYTTITVLVPPRNLMID	150

OGTA025a (SEQ ID No: 1)	IQKDTAVEGEEIEVNCTAMASKPATTIRWFKGNTELKKGSEVEEWSDMYT	200
OGTA025b (SEQ ID No: 2)	IQRDTAVEGEEIEVNCTAMASKPATTIRWFKGNTELKKGSEVEEWSDMYT	200

OGTA025a (SEQ ID No: 1)	VTSQLMLKVHKEDDGV VPVICQVEHPAVTGNLQ TQRYLEVQYKQVHIQMT	250
OGTA025b (SEQ ID No: 2)	VTSQLMLKVHKEDDGV VPVICQVEHPAVTGNLQ TQRYLEVQYKQVHIQMT	250

OGTA025a (SEQ ID No: 1)	YPLQGLTREGDALELTCEAIGKQPVMVTWVRVDEMPQHAVLSGPNLFI	300
OGTA025b (SEQ ID No: 2)	YPLQGLTREGDALELTCEAIGKQPVMVTWVRVDEMPQHAVLSGPNLFI	300

OGTA025a (SEQ ID No: 1)	NNLNKTDNGTYR CEASNIVGK AHSDYMLYVYDPTTATTEPAVHGLTQLPNS	350
OGTA025b (SEQ ID No: 2)	NNLNKTDNGTYR CEASNIVGK AHSDYMLYVYDPTTIPPTTTTTTTTT	350
*****..* *.. * ..:		
OGTA025a (SEQ ID No: 1)	AEELDSEDLSDSRAGEEGSIRAVDHAVIGGVAVVVFAMLCLLIILGRYF	400
OGTA025b (SEQ ID No: 2)	TTTILT-IITDSRAGEEGSIRAVDHAVIGGVAVVVFAMLCLLIILGRYF	399
: : : :*****		
OGTA025a (SEQ ID No: 1)	ARHK GTYFTHEAK GADDAADADTAIINAEGGQNNSEEKKEYFI	443
OGTA025b (SEQ ID No: 2)	ARHK GTYFTHEAK GADDAADADTAIINAEGGQNNSEEKKEYFI	442

Péptidos de la misma masa (negrita):

- CEASNIVGK [5]
- GTYFTHEAK [7]
- QTIYFR [8]
- SDDSVIQLLNPNR [9]

Péptidos en tándem (subrayados):

- SDDSVIQLLNPNR [9]

Figura 1b

Fuente del péptido: 1D-GE, Glioblastoma

```

OGTA025a (SEQ ID No: 1) MASVVLPSGSQCAAAAAAAAAAPPGLRLRLLLLLFSAAALIPDGDGQNLFTK 50
OGTA025b (SEQ ID No: 2) MASVVLPSGSQCAAAAAAAAAAPPGLRLRLLLLLFSAAALIPDGDGQNLFTK 50
*****

OGTA025a (SEQ ID No: 1) DVTVIEGEVATISQVNKSDDSVIQLLNPNRQTIYFRDFRPLKDSRFQLL 100
OGTA025b (SEQ ID No: 2) DVTVIEGEVATISQVNKSDDSVIQLLNPNRQTIYFRDFRPLKDSRFQLL 100
*****

OGTA025a (SEQ ID No: 1) NFSSELKVSILTNSISDEGRYFCQLYTDPPQESYTTITVLPVPPRNLMD 150
OGTA025b (SEQ ID No: 2) NFSSELKVSILTNSISDEGRYFCQLYTDPPQESYTTITVLPVPPRNLMD 150
*****

OGTA025a (SEQ ID No: 1) IQKDTAVEGEEIEVNCTAMASKPATTIRWFKGNTELKKGSEVEEWSDMYT 200
OGTA025b (SEQ ID No: 2) IQKDTAVEGEEIEVNCTAMASKPATTIRWFKGNTELKKGSEVEEWSDMYT 200
*****

OGTA025a (SEQ ID No: 1) VTSQMLKLVHKEDDGVVVICQVEHPAVTGNLQTRYLEVQYKPOVHIQMT 250
OGTA025b (SEQ ID No: 2) VTSQMLKLVHKEDDGVVVICQVEHPAVTGNLQTRYLEVQYKPOVHIQMT 250
*****

OGTA025a (SEQ ID No: 1) YPLQGLTREGDALELTCEAIGKQPVMVTWVRVDDEMPQHAVLSGPNLFI 300
OGTA025b (SEQ ID No: 2) YPLQGLTREGDALELTCEAIGKQPVMVTWVRVDDEMPQHAVLSGPNLFI 300
*****

OGTA025a (SEQ ID No: 1) NNLNKTDNGTYRCEASNIVGKAHSDYMLYVYDPTTATTEPAVHGLTQLPNS 350
OGTA025b (SEQ ID No: 2) NNLNKTDNGTYRCEASNIVGKAHSDYMLYVYDPTTIPPTTTTTTTTTT 350
*****.:* *.. * ..:

OGTA025a (SEQ ID No: 1) AEELDSEDLSDSRAGEEGSIRAVDHAIVGGVAVVVFAMLCLLIILGRYF 400
OGTA025b (SEQ ID No: 2) TTTILT-IITDSRAGEEGSIRAVDHAIVGGVAVVVFAMLCLLIILGRYF 399
: : : :*****

OGTA025a (SEQ ID No: 1) ARHKGTYFTHEAKGADDAADADTAIINAEGGQNNSEEKKEYFI 443
OGTA025b (SEQ ID No: 2) ARHKGTYFTHEAKGADDAADADTAIINAEGGQNNSEEKKEYFI 442
*****
    
```

Péptidos de la misma masa (negrita):

```

AGEEGSIR [4]
CEASNIVGK [5]
DFRPLK [6]
QTIYFR [8]
SDDSVIQLLNPNR [9]
    
```

Péptidos en tándem (subrayados):

```

SDDSVIQLLNPNR [9]
    
```

Figura 1c

Fuente del péptido: iTRAQ, Cáncer de Pulmón

```

OGTA025a (SEQ ID No: 1) MASVVLPSGSQCAAAAAAAAAAPPGLRLRLLLLLFSAAALIPTGDGQNLFTK 50
OGTA025b (SEQ ID No: 2) MASVVLPSGSQCAAAAAAAAAAPPGLRLRLLLLLFSAAALIPTGDGQNLFTK 50
*****

OGTA025a (SEQ ID No: 1) DVTVIEGEVATISCVNKSDDSVIQLLNPNRQTIYFRDFRPLKDSRFQLL 100
OGTA025b (SEQ ID No: 2) DVTVIEGEVATISCVNKSDDSVIQLLNPNRQTIYFRDFRPLKDSRFQLL
100
*****

OGTA025a (SEQ ID No: 1) NFSSELKVSILTNSISDEGRYFCQLYDPPQESYTTITVLVPPRNLMD 150
OGTA025b (SEQ ID No: 2) NFSSELKVSILTNSISDEGRYFCQLYDPPQESYTTITVLVPPRNLMD 150
*****

OGTA025a (SEQ ID No: 1) IQKDTAVEGEEIEVNCTAMASKPATTIRWFKGNTELKKGKSEVEEWSDMYT 200
OGTA025b (SEQ ID No: 2) IQKDTAVEGEEIEVNCTAMASKPATTIRWFKGNTELKKGKSEVEEWSDMYT 200
*****

OGTA025a (SEQ ID No: 1) VTSQLMLKVHKEDDGVFVICQVEHPAVTGNLQTRYLEVQYKQVHIQMT 250
OGTA025b (SEQ ID No: 2) VTSQLMLKVHKEDDGVFVICQVEHPAVTGNLQTRYLEVQYKQVHIQMT 250
*****

OGTA025a (SEQ ID No: 1) YPLQGLTREGDALELTCEAIGKQPVMVTWVRVDEMPQHAVLSGPNLFI 300
OGTA025b (SEQ ID No: 2) YPLQGLTREGDALELTCEAIGKQPVMVTWVRVDEMPQHAVLSGPNLFI 300
*****

OGTA025a (SEQ ID No: 1)>NNLNKTDNGTYRCEASNIVGKAHSDYMLYVYDATTATTEPAVHGLTQLPNS 350
OGTA025b (SEQ ID No: 2)>NNLNKTDNGTYRCEASNIVGKAHSDYMLYVYDPPPTTIPPTTTTTTTTTT 350
*****..:* *.. * ..:

OGTA025a (SEQ ID No: 1) AEELDSEDLSDSPAGEEGSIRAVDHAVIGGVAVVVFAMLCLLIILGRYF 400
OGTA025b (SEQ ID No: 2) TTTILT-IITDSPAGEEGSIRAVDHAVIGGVAVVVFAMLCLLIILGRYF 399
: : : :*****

OGTA025a (SEQ ID No: 1) ARHKGTYFTHEAKGADDAADADTAIINAEGGQNNSEEKKEYFI 443
OGTA025b (SEQ ID No: 2) ARHKGTYFTHEAKGADDAADADTAIINAEGGQNNSEEKKEYFI 442
*****

```

Péptidos de la misma masa (negrita):

Péptidos en tándem (subrayados):

AGEEGSIR [4]

Figura 1d

Fuente del péptido: 1D-GE, Cáncer de Pulmón

```

OGTA025a (SEQ ID No: 1) MASVVLPSGSQCAAAAAAAAAAPPGLRLLPLLLLLFSAAALIPDGDGQNLFTK 50
OGTA025b (SEQ ID No: 2) MASVVLPSGSQCAAAAAAAAAAPPGLRLLPLLLLLFSAAALIPDGDGQNLFTK 50
*****

OGTA025a (SEQ ID No: 1) DVTVIEGEVATISQVKNKSDDSVIQLLNENRQTIYFRDFRPLKDSRFQLL 100
OGTA025b (SEQ ID No: 2) DVTVIEGEVATISQVKNKSDDSVIQLLNENRQTIYFRDFRPLKDSRFQLL 100
*****

OGTA025a (SEQ ID No: 1) NFSSELKVSILTNSISDEGRYFCQLYDPPQESYTTITVLVPPRNLMID 150
OGTA025b (SEQ ID No: 2) NFSSELKVSILTNSISDEGRYFCQLYDPPQESYTTITVLVPPRNLMID 150
*****

OGTA025a (SEQ ID No: 1) IQKDTAVEGEEIEVNCTAMASKPATTIRWFKGNTELKKGSEVEEWSMYT 200
OGTA025b (SEQ ID No: 2) IQKDTAVEGEEIEVNCTAMASKPATTIRWFKGNTELKKGSEVEEWSMYT 200
*****

OGTA025a (SEQ ID No: 1) VTSQLMLKVHKEDDGVFVICQVEHPAVTGNLQIQRYLEVQYKPOVHIQMT 250
OGTA025b (SEQ ID No: 2) VTSQLMLKVHKEDDGVFVICQVEHPAVTGNLQIQRYLEVQYKPOVHIQMT 250
*****

OGTA025a (SEQ ID No: 1) YFLOGLTREGDALELTCEAIGKQPVMVTWVRVDDEMPOHAVLSGPNLFI 300
OGTA025b (SEQ ID No: 2) YFLOGLTREGDALELTCEAIGKQPVMVTWVRVDDEMPOHAVLSGPNLFI 300
*****

OGTA025a (SEQ ID No: 1) NNLNKTDNGTYRCEASNIVGKAHSDYMLVYDPTTATTEPAVHGLTQLPNS 350
OGTA025b (SEQ ID No: 2) NNLNKTDNGTYRCEASNIVGKAHSDYMLVYDPTTIPPTTTTTTTTTTT 350
*****
..* *.. * ..:

OGTA025a (SEQ ID No: 1) AEELDSEDLSDSRAGEEGSIRAVDHAIVGGVVAVVVFAMLCLLIILGRYF 400
OGTA025b (SEQ ID No: 2) TTTILT-IIITDSRAGEEGSIRAVDHAIVGGVVAVVVFAMLCLLIILGRYF 399
: : : :*****

OGTA025a (SEQ ID No: 1) ARHKGTYFTEAKGADDAADADTAIINAEGGONNSEEKKEYFI 443
OGTA025b (SEQ ID No: 2) ARHKGTYFTEAKGADDAADADTAIINAEGGONNSEEKKEYFI 442
*****
    
```


Figura 1e

Péptidos de la misma masa (negrita):

AGEEGSIR [4]
DTAVEGEEIEVNCTAMASK [25]
DVTVIEGEVATISCQVNK [26]
EDDGVPVICQVEHPAVTGNLQTR [12]
EGDALELTCEAIGK [13]
FQLLNFSSELK [14]
GADDAADADTAIINABGGQNNSEEK [15]
GTYFHEAK [7]
LLLLLFSAAALIPTGDGQNLFTK [16]
MASVVLPSGSQCAAAAAAAPPGLR [17]
NLMIDIQR [18]
PQPVMVTWVR [19]
PQVHIQMTYPLQGLTR [20]
QTIYFR [8]
SDDSVIQLLNPNR [9]
TDNGTYR [21]
VDDEMPQHAVLSGPNLFINNLNK [22]
YFCQLYTDPPQESYTTITVLVPPR [23]
YLEVQYK [24]

Péptidos en tándem (subrayados):

Figura 2a

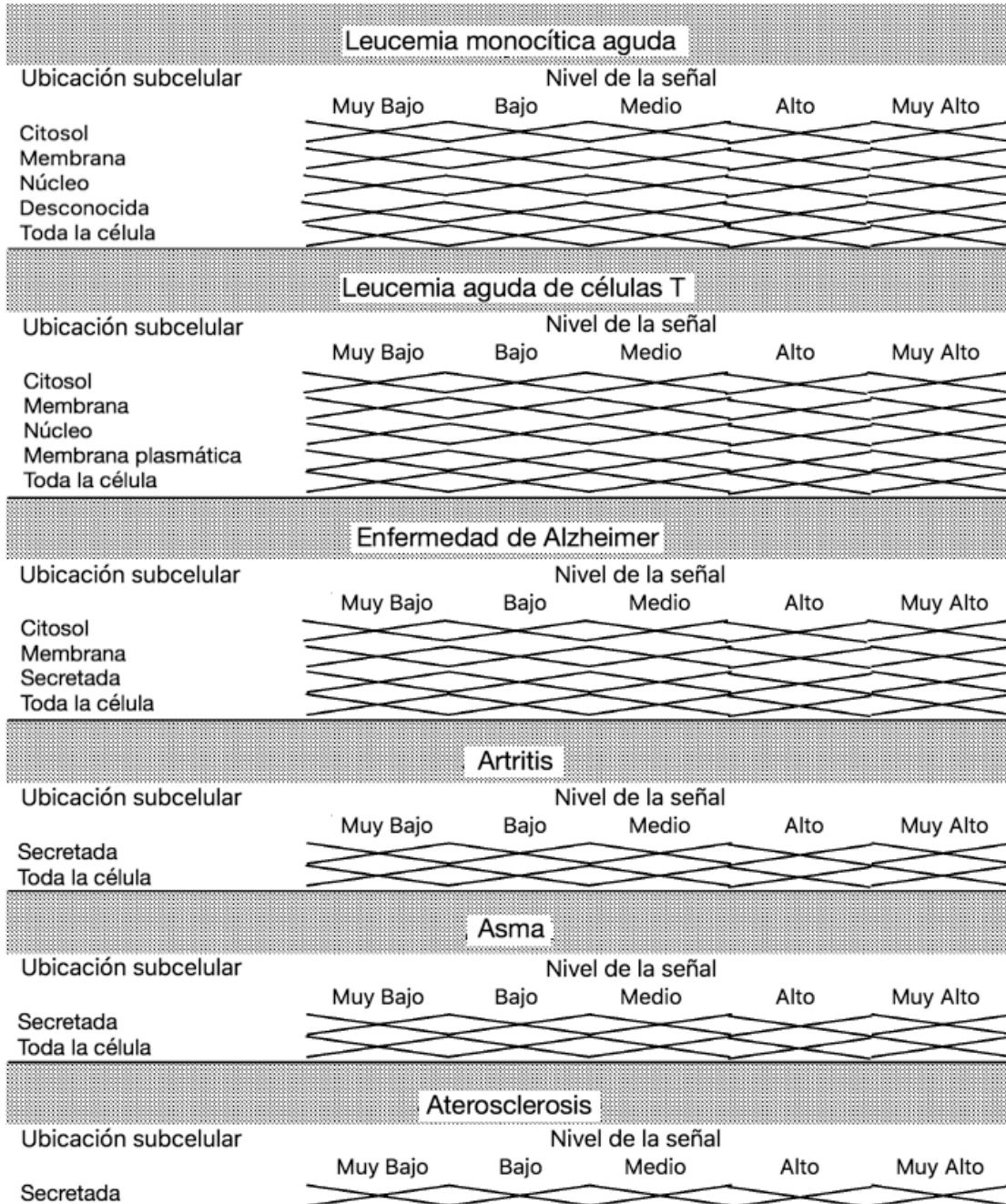


Figura 2b

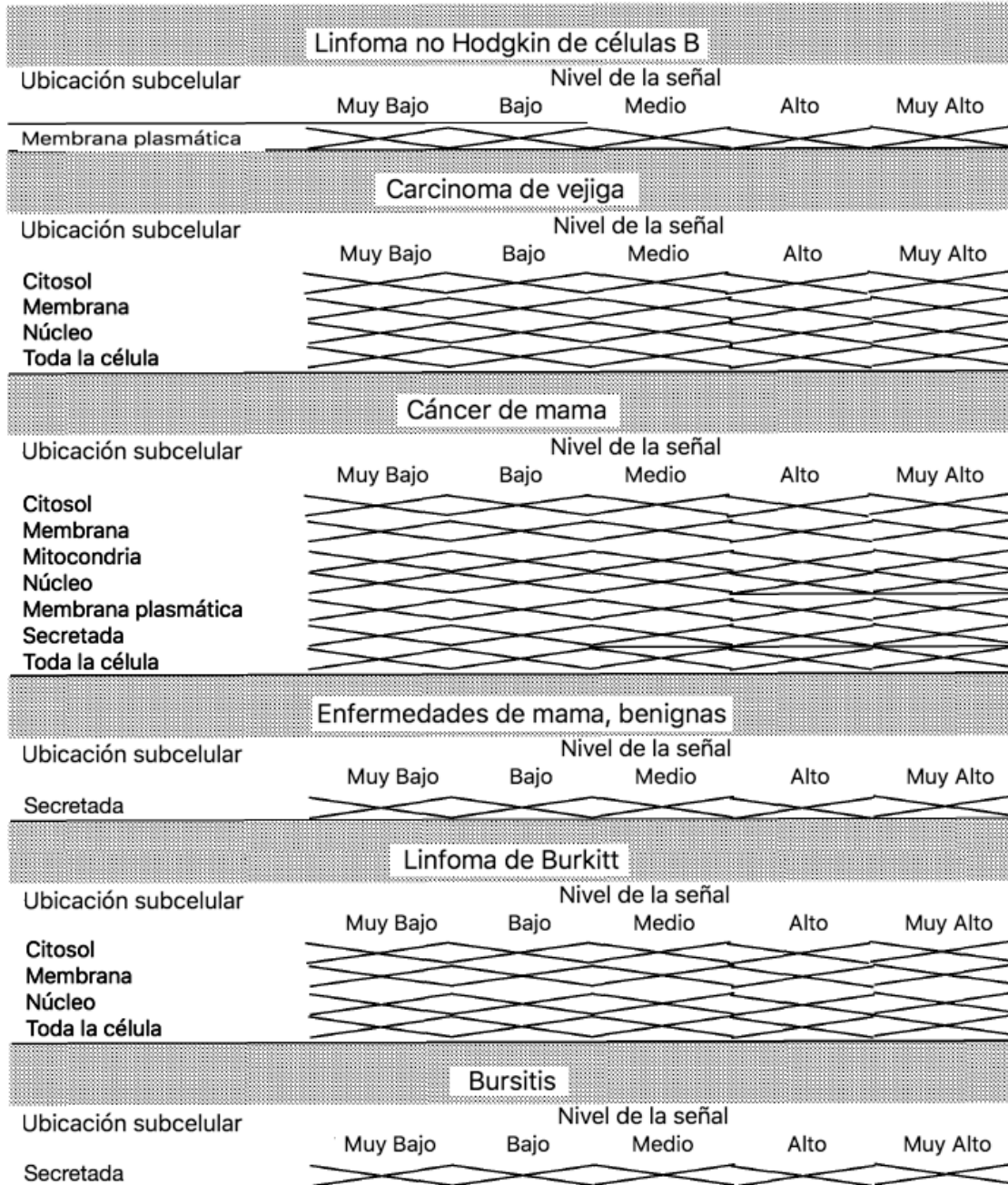


Figura 2c

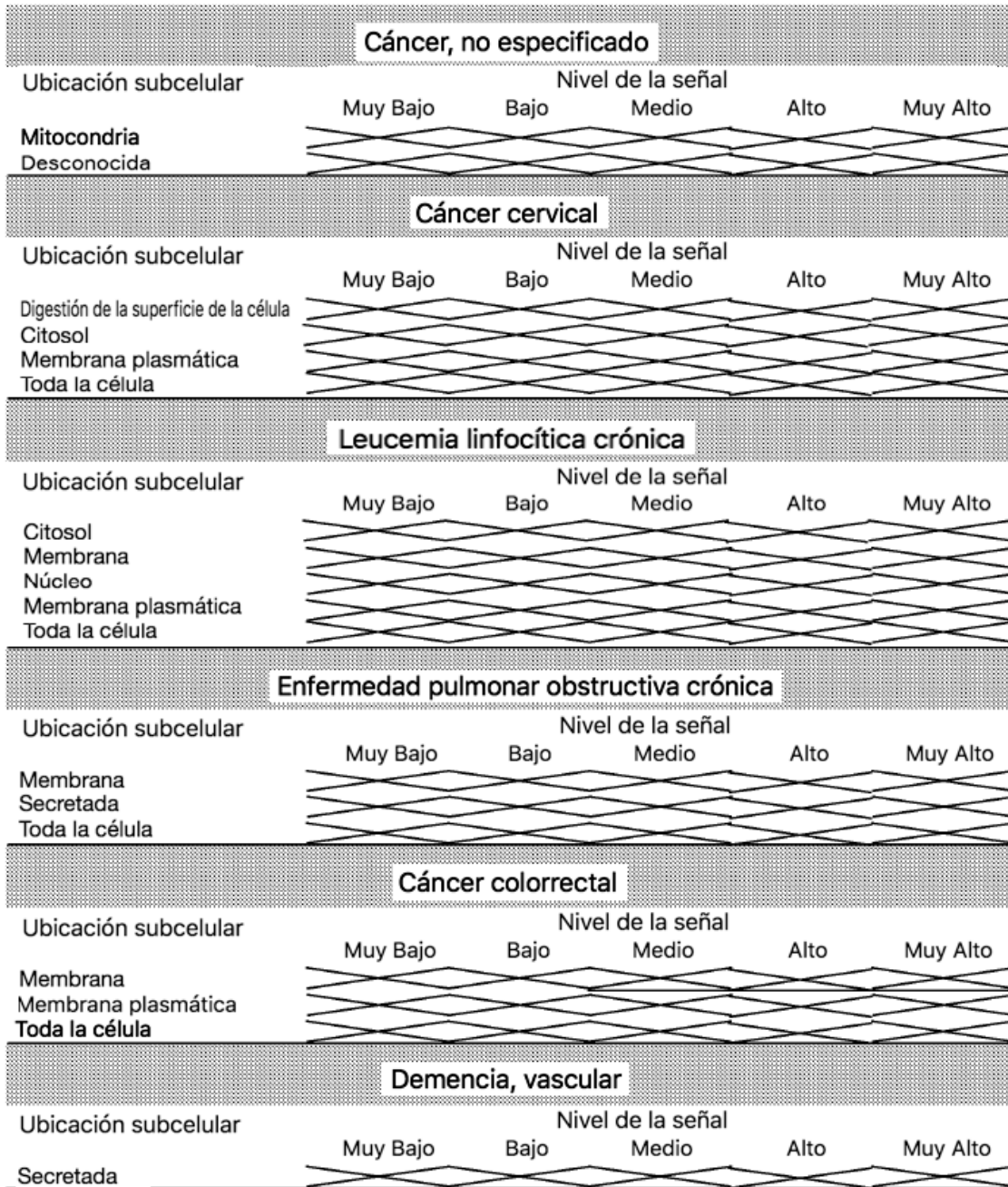


Figura 2d

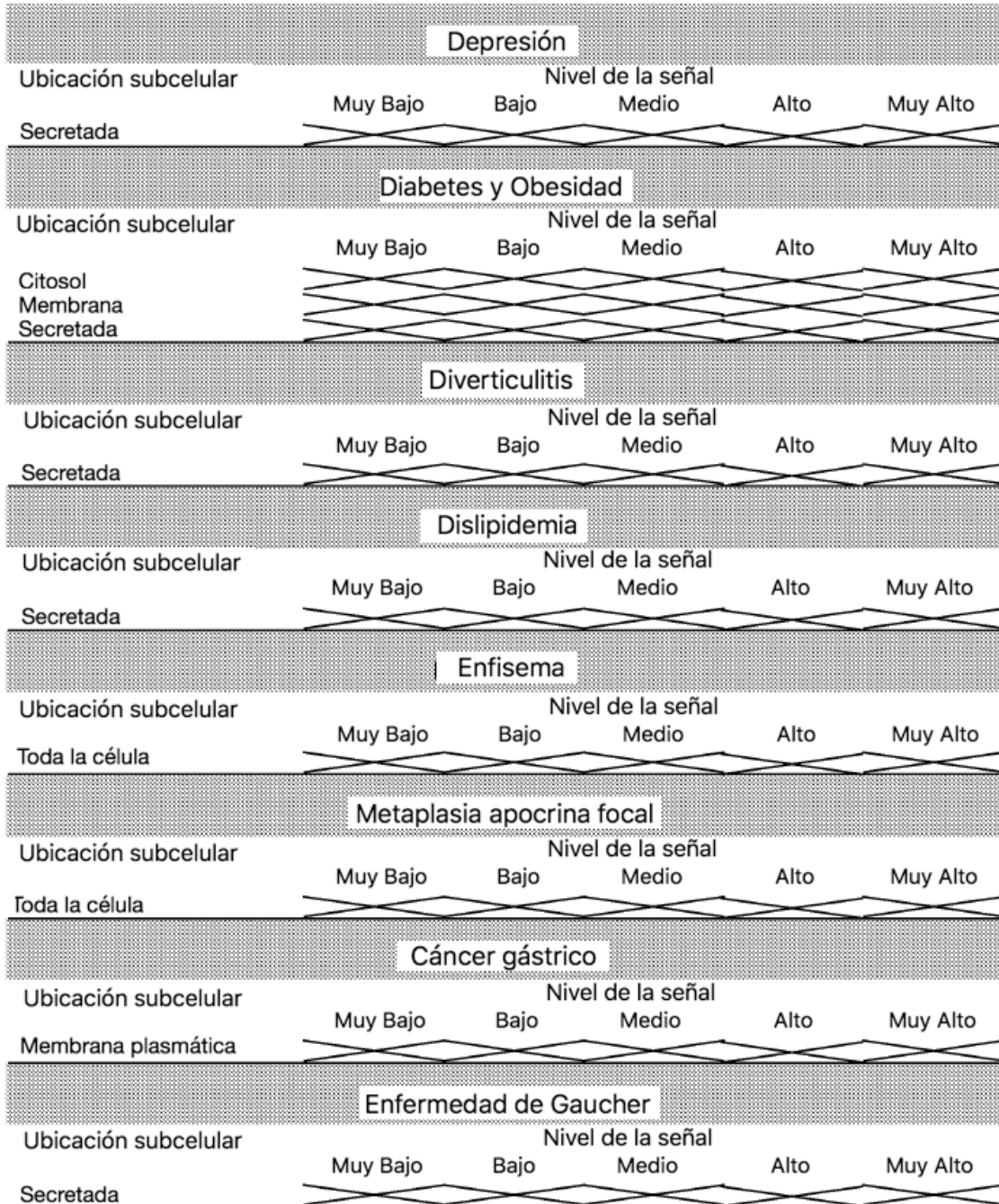


Figura 2e

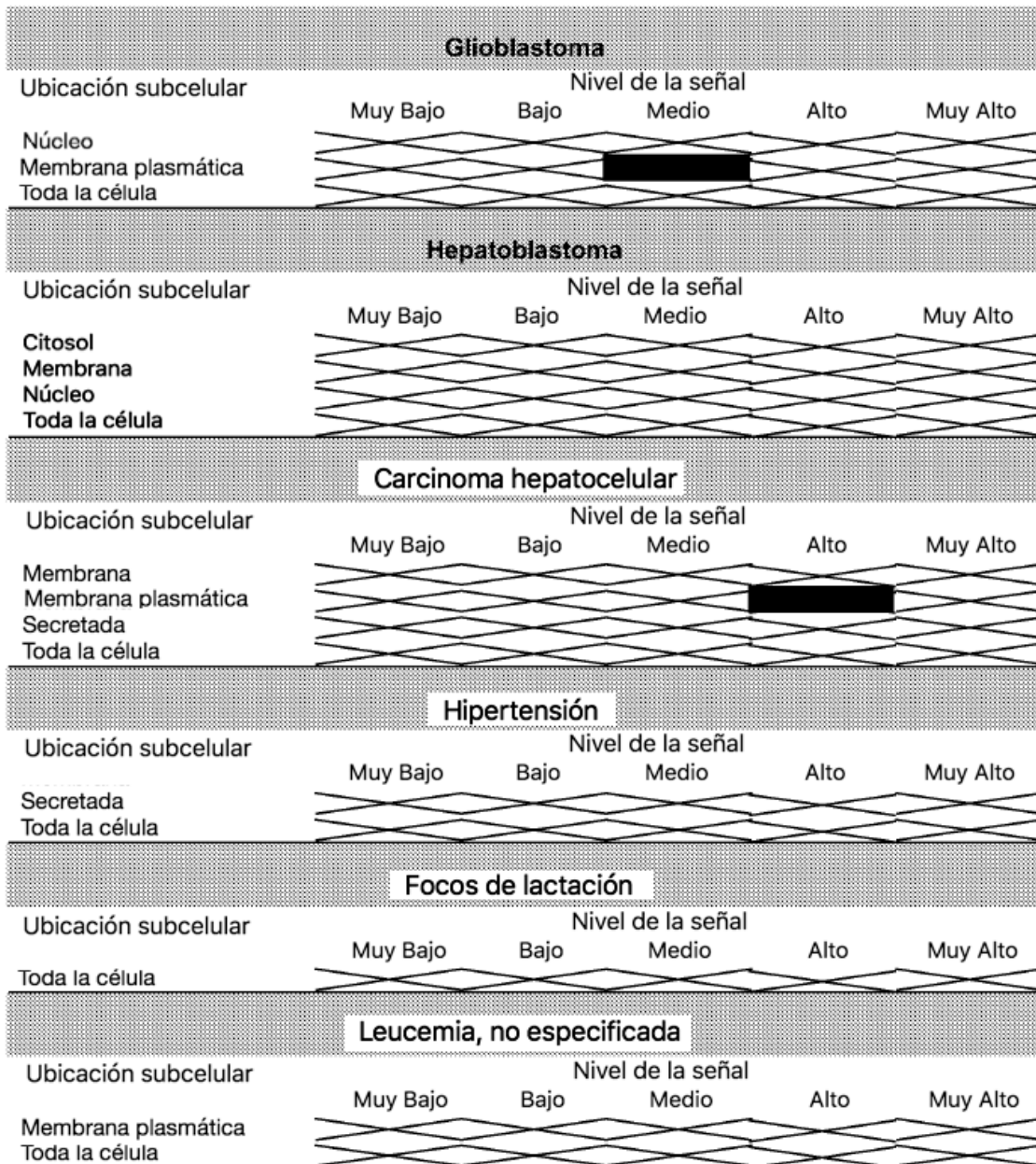


Figura 2f

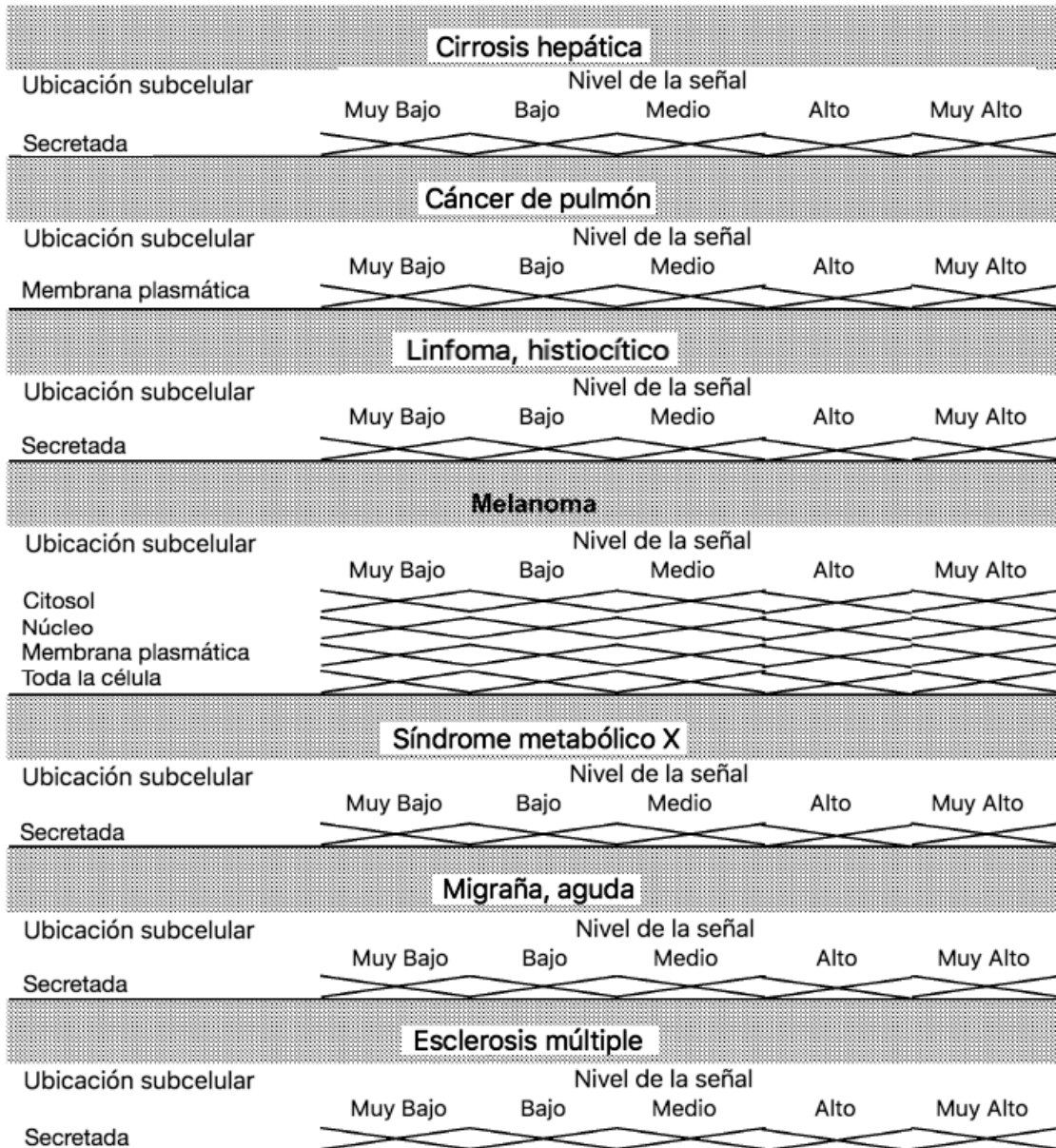


Figura 2g

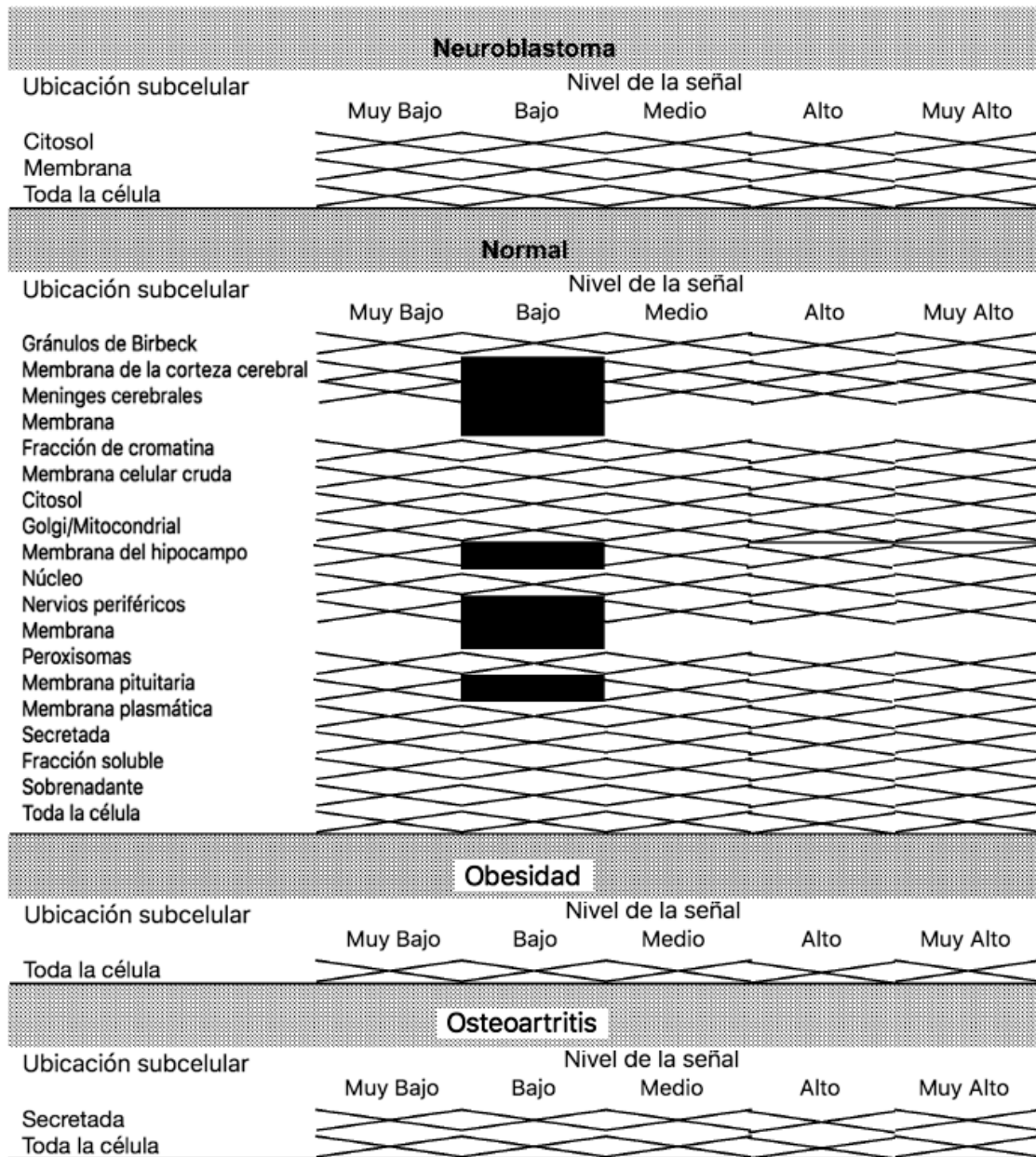


Figura 2h

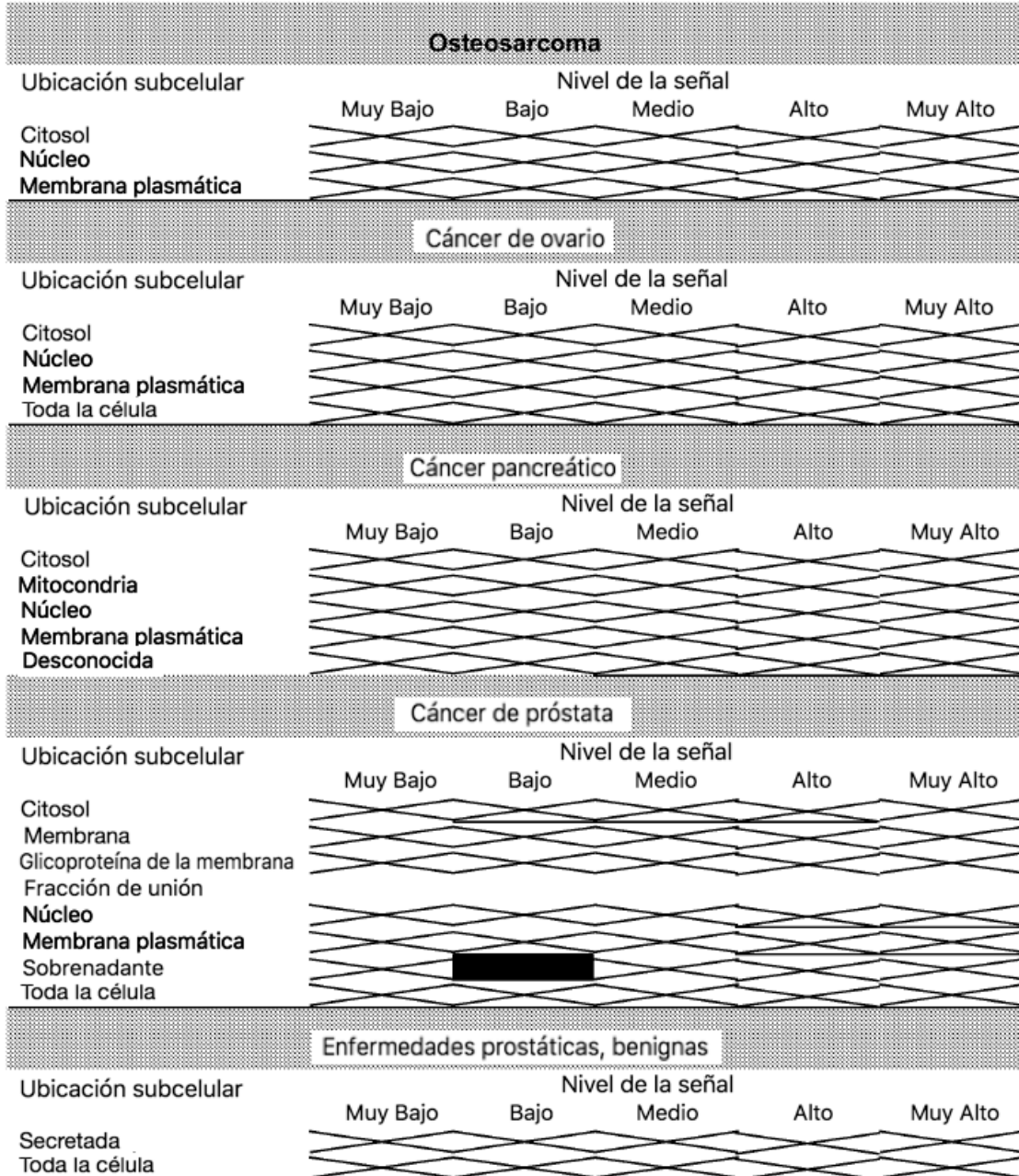


Figura 2i

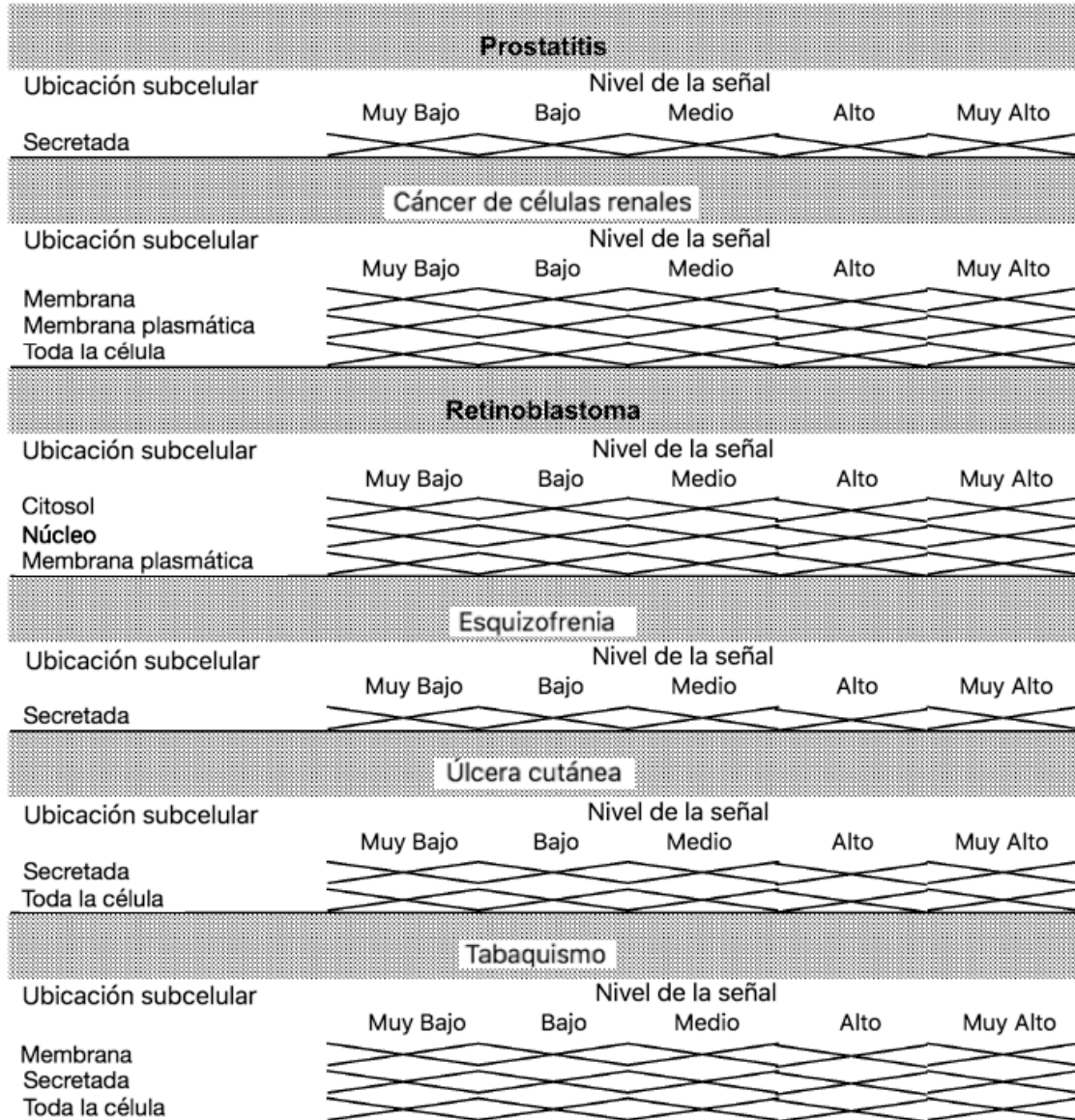


Figura 2j

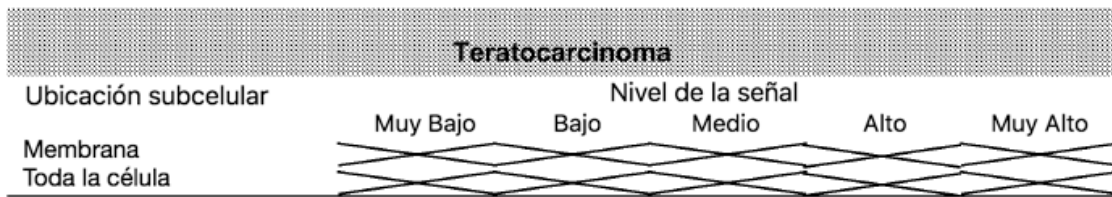


Figura 3

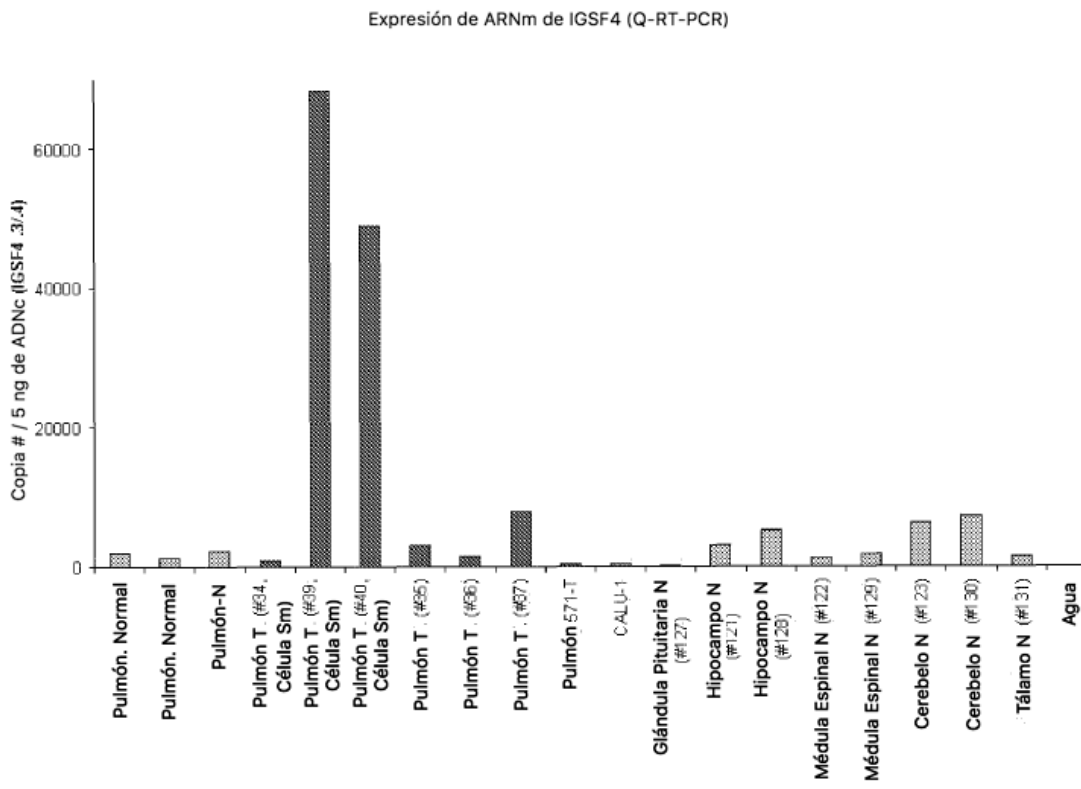


Figura 4

Secuencia de OGTA025 usada para inmunización (SEQ ID No: 3):

MRAWIFFLLCLAGRALTQNLFTKDVTVIEGEVATISCVNKSDDSVIQLLNPNRQTIYFRDFRPLKDSRFQLL
NFSSSELKVSLTNVSIISDEGRYFCQLYTDPPQESYTTITVLVPPRNLMIQIQRDTAVEGEEIEVNCTAMASKP
ATTIRWFKGNTELKKGSEVEEWSDMYTVTSQLMLKVHKEDDGVPVICQVEHPAVTGNLQTRYLEVQYKPVH
IQMTYPLQGLTREGDALELTCEAIGKPQPMVTWVRVDEMPQHAVLSGPNLFINNLNKTONGTYRCEASNIV
GKAHSDYMLYVYDSRAGEEGSIRAVDASHHHHHH*

Figura 5

