



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 331 106**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/435** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00990937 .5**

96 Fecha de presentación : **15.12.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1237915**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.09.2002**

54 Título: **Polinucleótido que codifica el polipéptido RG1.**

30 Prioridad: **16.12.1999 US 172370 P**  
**07.12.2000 US 732357 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**22.12.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**22.12.2009**

73 Titular/es:  
**Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft**  
**Müllerstrasse 178**  
**13353 Berlin, DE**

72 Inventor/es: **Harkins, Richard;**  
**Parkes, Deborah;**  
**Parry, Gordon;**  
**Schneider, Douglas, W. y**  
**Steinbrecher, Renate**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 331 106 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

Polinucleótido que codifica el polipéptido RG1.

- 5 La presente solicitud reivindica los derechos de la solicitud provisional de patente US nº 60/172.370, presentada el 16 de diciembre de 1999, que se incorpora en su totalidad como referencia a la presente memoria.

## Campo de la invención

- 10 La presente invención se refiere, en parte, a polinucleótidos y polipéptidos nuevamente identificados; a variantes y derivados de dichos polinucleótidos y polipéptidos; a métodos para preparar dichos polinucleótidos y polipéptidos, y sus variantes y derivados; a anticuerpos dirigidos a dichos polipéptidos, sus variantes y derivados; y a utilizaciones de dichos polinucleótidos, polipéptidos, variantes, derivados y anticuerpos. Particularmente, en este y otros aspectos, la presente invención gira en torno a nuevos polipéptidos de matriz extracelular humana (designados RG1), a poli-  
15 nucleótidos que codifican dichos polipéptidos, a anticuerpos dirigidos hacia dichos polipéptidos y a polinucleótidos antisentido que bloquean la expresión de RG1.

## Antecedentes de la invención

- 20 El cáncer de próstata es una enfermedad de aparición frecuente en el hombre, encontrándose en aproximadamente un tercio de los hombres mayores de 45 años. Existen pruebas de causas tanto genéticas como medioambientales, siendo probablemente la mayoría de casos consecuencia de una combinación de ambos factores. Los estudios de cáncer familiar han sugerido que la predisposición genética tiene un papel en aproximadamente el 5-10% de todos los cánceres de próstata, y en aproximadamente el 45% de los casos en hombres menores de 55 años.

- 25 Existen pruebas de que el cáncer de próstata se desarrolla como una enfermedad multietapa, siendo una de las lesiones precursoras la neoplasia intraepitelial prostática (PIN). Las fases tempranas de la enfermedad son dependientes de los andrógenos, mientras que las etapas posteriores son independientes de las hormonas. Existe un desorden proliferativo de la próstata conocido como hiperplasia prostática benigna que se detecta clínicamente, pero que probablemente no es una etapa en el desarrollo de cáncer. Sin embargo, se asocia frecuentemente al cáncer de próstata. A menudo los cánceres en la próstata son multifocales, generalmente de crecimiento lento y heterogéneos. A menudo, los cánceres en etapa avanzada producen metástasis en nódulos linfáticos y huesos.

- 30 Habitualmente, el cáncer de próstata se diagnostica mediante examen físico y mediante los niveles de antígeno específico de la próstata (PSA) en suero. La prostatectomía radical es el tratamiento preferido para la enfermedad localizada. Actualmente, la enfermedad metastásica avanzada se trata por ablación androgénica inducida por orquiectomía o tratamiento con GnRH (hormona liberadora de gonadotropina) y mediante terapia antiandrógenos. Sin embargo, la enfermedad avanzada crea casi invariablemente resistencia a las hormonas, y no existe curación para la enfermedad progresiva. Además, existen graves efectos secundarios asociados tanto a la prostatectomía radical como a la terapia por ablación androgénica. Dichos efectos secundarios incluyen un elevado riesgo de incontinencia e impotencia asociadas a la prostatectomía radical y de fracturas óseas y osteoporosis asociadas a la terapia por ablación androgénica.

- 35 En consecuencia, existe una considerable necesidad de nuevos enfoques terapéuticos para cáncer de próstata tanto en estado precoz como avanzado. Existe también una necesidad significativa de nuevos agentes de diagnóstico, particularmente agentes que puedan discriminar las fases de la enfermedad, ya que esto determina significativamente las opciones de tratamiento. Por ejemplo, si la enfermedad ha progresado más allá de la próstata y ha producido metástasis en los nódulos linfáticos, no se lleva a cabo la prostatectomía radical, ya que la misma no tiene ningún efecto en la progresión de la enfermedad, pudiendo tener en cambio considerables efectos secundarios no deseados. Sería realmente valioso un agente que pudiera detectar la metástasis *in vivo*.

- 40 Se han demostrado en el cáncer de próstata cambios en la expresión de proteínas específicas, incluyendo una expresión anormal de p53 en el cáncer de próstata avanzado, niveles reducidos de receptores TGF- $\beta$ , niveles reducidos de E-cadherina, C-Cam (una molécula de adhesión celular), y diversas integrinas. La expresión del oncogen bcl-2 es sorprendentemente elevada en los tumores independientes de los andrógenos de etapa avanzada, y la prognosis para los pacientes con expresión de bcl-2 en niveles elevados es relativamente pobre. Mientras que los cambios mencionados anteriormente en la expresión génica están bien documentados, no se han identificado cambios en la expresión que se hayan demostrado causantes de la enfermedad. En consecuencia, resultaría útil identificar nuevas proteínas cuya expresión esté ligada a la presencia o desarrollo de tumores prostáticos, las cuales podrían servir como dianas en el diagnóstico y la terapia del cáncer de próstata.

- 45 La presente invención da a conocer un nuevo homólogo a una superfamilia de proteínas de matriz extracelular. dicho homólogo, designado RG1, se expresa en el tejido prostático y puede estar sobreexpresado en los tumores prostáticos.

- 50 La matriz extracelular es un complejo entramado de colágeno y elastina integrado en una sustancia de matriz viscoelástica compuesta de proteoglicanos y glicoproteínas. Dicha matriz existe como una estructura de soporte tridimensional que aísla los compartimentos de los tejidos, media en la fijación celular y determina la arquitectura de los tejidos (Bissel *et al*, J. Theor. Biol. 99: 31-68, 1982; Carlson *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2403-2406, 1981).

La matriz actúa como un filtro macromolecular (Hay, E.D., Cell Biology of Extracellular Matrix, Nueva York, Plenum Press, 1982) y afecta a la citodiferenciación, la mitogénesis y la morfogénesis (Gospodarowicz, D., Cancer Res. 38: 4155-171, 1978). Las interacciones bioquímicas entre células normales y la matriz pueden ser alteradas en las neoplasias, y esto puede afectar a la proliferación tumoral. Las células tumorales pueden interactuar con la matriz de diversas maneras. En primer lugar, las células tumorales se pueden fijar a la matriz a través de receptores específicos de membrana plasmática (Terranova *et al*, Cancer Res. 42: 2265-2269, 1982). En segundo lugar, la degradación de la matriz está mediada por una cascada de enzimas a la que contribuyen la célula tumoral y la huésped (Eisen *et al*, Bioch. Biophys. Acta 151: 637-645, 1968). En tercer lugar, en zonas diferenciadas del tumor, las células tumorales pueden sintetizar y acumular matriz o inducir a la célula huésped a acumular matriz en exceso (Brownstein *et al*, Cancer 40: 2979-2986, 1977).

El RG1 muestra homología con una superfamilia de proteínas de matriz extracelular codificadas por los genes Mindin/F-spondin. La familia de genes está unida por dos dominios de spondin conservados, FS1 y FS2, próximos al terminal amino, y como mínimo una repetición de trombospondin de tipo 1 (TSR1) en el terminal carboxi (Shimeld, S.M., Mol. Biol. Evol. 15(9): 1218-1223, 1998). El motivo TSR se encontró originalmente en las proteínas de matriz extracelular de vertebrados (Bornstein, P., J. Cell Biol. 130: 503-506, 1995) y posteriormente se ha encontrado en otras diversas proteínas de matriz extracelular. Existen diversas líneas de demostración de que los TSR median en la adhesión celular y juegan un papel clave en la tumorigénesis. Por ejemplo, se ha demostrado que los fragmentos proteolíticos de trombospondin que contienen los TSR y los péptidos sintéticos que presentan secuencias correspondientes a la región de TSR de la trombospondin favorecen la adhesión de células tumorales y la metástasis (Prater *et al*, J. Cell Biol. 112: 1031-1040, 1991; Tuszynski y Nicosia, BioEssays 18: 71-76, 1996), tienen actividad antiangiogénica (Tolsma *et al*, J. Cell Biol. 122: 497-511, 1993) e inhiben la agregación plaquetaria y la metástasis de melanoma (Tuszynski *et al*, J. Cell Biol. 116: 209-217, 1992).

Actualmente, los miembros de esta superfamilia incluyen un gen en *Caenorhabditis elegans*, un gen individual en *Drosophila* y múltiples genes en vertebrados. En *C. elegans*, el gen F10E7.4 codifica cinco TSR además de los dominios FS1 y FS2 (Higashijima *et al*, Dev. Biol. 192: 211-227, 1997). En *Drosophila*, el miembro de la familia designado M-spondin (mspo) contiene los dominios FS1 y FS2 y un único TSR (Umemiya *et al*, Dev. Biol. 186: 185-176, 1997). El gen de M-spondin codifica una proteína secretada que se localiza en los puntos de fijación muscular y parece funcionar como una proteína de matriz extracelular que soporta la fijación músculo-apodema. Los miembros de familia en vertebrados incluyen genes aislados de pez cebra (Mandin1 y Mandin2, F-spondin1, y F-spondin2), F-spondin de rata, F-spondin de *Xenopus* y Mandin de rata. Mandin1 y Mandin2 están estrechamente relacionados entre ellos y presentan una estructura génica similar a la de M-spondin de *Drosophila*. Los genes Mandin1 y Mandin2 codifican un único TSR además de los dominios FS1 y FS2 (Higashijima *et al*, Dev. Biol. 192: 211-227, 1997). Los genes F-spondin1 y F-spondin2 de pez cebra, F-spondin de rata (Klar *et al*, Cell 69:95-110, 1992) y F-spondin de *Xenopus* (Altaba *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 8268-8272) presentan estructuras similares y codifican seis copias de los TSR además de los dominios FS1 y FS2. En los vertebrados, la superfamilia Mindin/F-spondin se puede clasificar en dos grupos: los genes estrechamente relacionados con los genes originales F-spondin y Mindin de rata y los genes estrechamente relacionados con el gen M-spondin de *Drosophila*. Los dos genes Mindin y F-spondin de vertebrados codifican proteínas expresadas principalmente por la placa ventral del tubo neural durante el desarrollo embrionario.

Recientemente, un gen individual relacionado con F-spondin, el AmphiF-spondin, ha sido aislado a partir de anfibios (Shimeld, S.M., Mol. Biol. Evol. 15(9) 1218-1223, 1998). Sobre la base de la filogenética molecular, el AmphiF-spondin está estrechamente relacionado con un subgrupo particular de genes F-spondin de vertebrados que codifican seis TSR. AmphiF-spondin codifica tres TSR y dos repeticiones de fibronectina de tipo III, una de las cuales tiene una fuerte identidad con una repetición de fibronectina de tipo III del gen eliminado en el cáncer colorrectal (DCC). La expresión de la proteína se encuentra en la mayoría del sistema nervioso central y no está confinada a la línea media, tal como se describe para las proteínas Mindin y F-spondin de vertebrados.

Estos datos sugieren que las proteínas de matriz extracelular, tal como la nueva proteína RG1, que es un homólogo de la superfamilia Mindin/F-spondin, pueden ser buenos candidatos para su utilización en el diagnóstico del cáncer y sus intervenciones terapéuticas.

El documento WO 98/45442 se refiere a un polipéptido secretado zsig25 expresado en un nivel muy elevado en el tejido prostático y a anticuerpos contra el polipéptido zsig25. La secuencia de aminoácidos del polipéptido zsig25 corresponde esencialmente a la secuencia del polipéptido RG1. Sin embargo, no se ha identificado ningún epítope del polipéptido zsig25.

## Sumario de la invención

La presente invención da a conocer una secuencia de polinucleótido que codifica únicamente una nueva proteína a la que se hace referencia a la presente memoria como RG1. El polipéptido RG1 muestra homología con la proteína de matriz extracelular Mindin de rata. Contiene una secuencia de señal hidrofóbica en el terminal N, los dominios spondin (FS1 y FS2) y una repetición trombospondina de tipo 1 en su terminal C. RG1 muestra una similitud del 89,7% con respecto a Mindin de rata. La secuencia de polinucleótido, a la que se hace referencia en la presente memoria como *rg1* y descrita en la figura 1 (SEC ID n°: 1) codifica la secuencia de aminoácidos para RG1, que se muestra en la figura 2 (SEC ID n°: 2).

Con estos objetivos y otros, la presente invención da a conocer polipéptidos, entre otros, que han sido identificados como nuevas proteínas con homología con respecto a la familia Mindin de proteínas de matriz extracelular, tal como se muestra por comparación de la secuencia de aminoácidos representada en la figura 2 (SEC ID n°: 2) y secuencias de aminoácidos conocidas de otras proteínas de matriz extracelular.

Además, la presente invención da a conocer polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos, particularmente polinucleótidos que codifican el polipéptido al que se hace referencia en la presente memoria como RG1.

Se dan a conocer polinucleótidos aislados que codifican RG1, incluyendo ARNm, ADNc y variantes, análogos o derivados biológica, diagnóstica, clínica o terapéuticamente útiles de los mismos, o fragmentos de los mismos, incluyendo fragmentos de las variantes, análogos y derivados.

Entre las formas de realización particularmente preferidas se encuentran variantes alélicas de procedencia natural de polinucleótidos que codifican variantes del polipéptido al que se hace referencia como RG1 en la presente memoria.

Se dan a conocer nuevos polipéptidos de origen humano a los que se hace referencia como RG1 en la presente memoria, así como fragmentos, variantes y derivados biológica, diagnóstica o terapéuticamente útiles de los mismos, variantes y derivados de dichos fragmentos, y análogos de los anteriores.

Entre las formas de realización particularmente preferidas se encuentran variantes de RG1 codificadas por variantes alélicas de procedencia natural del polinucleótido *rg1*.

También se da a conocer un procedimiento para preparar los polipéptidos mencionados anteriormente, fragmentos, variantes y derivados de polipéptidos, fragmentos de las variantes y derivados, y análogos de los anteriores. en una forma de realización preferida, se dan a conocer procedimientos para preparar los polipéptidos RG1 mencionados anteriormente, que comprenden el cultivo de células huésped que tienen incorporado un polinucleótido derivado exógenamente que codifica RG1 en condiciones para la expresión de RG1 humano en un huésped y a continuación la recuperación del polipéptido expresado.

Se dan a conocer productos, composiciones, procedimientos y métodos que utilizan los polipéptidos y polinucleótidos mencionados anteriormente, entre otros, con propósitos investigativos, biológicos, clínicos y terapéuticos.

Se dan a conocer productos, composiciones y procedimientos, entre otros, para determinar la expresión de RG1 en células por determinación de los polipéptidos RG1 o el ARNm que codifica RG1; y para determinar variaciones genéticas y aberraciones, tales como defectos, en los genes *rg1*.

De acuerdo con ciertas formas de realización preferidas, se dan a conocer sondas que se hibridizan con las secuencias *rg1*.

Un objetivo de la presente invención consiste en dar a conocer anticuerpos altamente selectivos para polipéptidos RG1 o fragmentos de los mismos, y los cuales se pueden utilizar en un método para el diagnóstico y/o la detección de la expresión de RG1, que puede estar asociada al cáncer de próstata. De acuerdo con ciertas formas de realización preferidas de este aspecto de la presente invención, se marcan anticuerpos de tal modo que se produzca una señal detectable. Resulta particularmente preferido un anticuerpo marcado con un marcador radiactivo, una enzima, un agente cromóforo un agente fluorescente.

En otro aspecto de la presente invención, se dan a conocer anticuerpos que se conjugan con un agente terapéutico para la administración a células *in vitro*, a células *ex vivo* y a células *in vivo*, o a un organismo pluricelular. En este sentido, resultan particularmente preferidos agentes terapéuticos que sean citotóxicos. en este sentido, ciertas formas de realización preferidas consisten en la administración de dichos anticuerpos conjugados a un paciente humano para el tratamiento de una enfermedad caracterizada por actividad o expresión de RG1, tal como el cáncer de próstata.

En otro aspecto de la presente invención, se dan a conocer péptidos y anticuerpos antiidiotípicos que se pueden utilizar para estimular una respuesta inmune.

Se dan a conocer ribozimas y polinucleótidos complementarios a los polinucleótidos *rg1* (es decir, polinucleótidos antisentido) para la administración a células *in vitro*, a células *ex vivo* y a células *in vivo*, o a un organismo pluricelular. En este sentido, resulta particularmente preferente la administración de moléculas antisentido a un paciente humano para el tratamiento de una enfermedad, tal como el cáncer de próstata o la hiperplasia prostática benigna, que se ve mejorada por la disminución del nivel de actividad de RG1.

Otros objetivos, características, ventajas y aspectos de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la siguiente descripción. Sin embargo, se debe entender que dicha descripción y los ejemplos específicos, aunque indican formas de realización preferidas de la presente invención, se proporcionan únicamente a título ilustrativo.

## Breve descripción de los dibujos

Figura 1: secuencia de polinucleótido de *rg1* (SEC ID n°: 1), que codifica la forma biológica o inmunológicamente activa de RG1.

Figura 2: secuencia de aminoácidos deducida de RG1 (SEC ID n°: 2), con los dominios F-spondin subrayados y el dominio de tromboespondina doblemente subrayado.

Figura 3: alineamiento de aminoácidos de RG1 con la secuencia de Mindin de rata. La secuencia de RG1 se encuentra en la parte superior.

Figura 4: secuencias de aminoácidos de polinucleótidos y deducidas de RG1.

Figura 5: expresión de ARNm *rg1* en tejidos humanos por análisis PCR basado en Taqman. El ARN de tejidos humanos, tanto tumorales como normales, se aisló mediante técnicas estándares. Se diseñaron cebadores y sondas para detectar la expresión de ARNm *rg1* utilizando el software Perkin Elmer's Primer Express y se sintetizaron mediante Synthetic Genetics. Se detectó ARNm *rg1* en tejidos de próstata humana. Se pudo detectar una expresión mucho menor de ARNm *rg1* en otros tejidos, por ejemplo hepáticos.

Figura 6: purificación de proteína RG1 nativa secretada por células LNCaP. Análisis Western blot utilizando antisuero generado contra una secuencia peptídica sintética de RG1 (3C, SEC ID n°: 10; véase ejemplo 4), a efectos de detectar proteína RG1 nativa secretada por células LNCaP. Fracciones de elución de cromatografía Q-Sefarosa de medio concentrado condicionado con células LNCaP: (L) carga de columna, (F) flujo de columna, (1-12) fracciones de elución a lo largo de gradiente salino. El peso molecular predicho de RG1 es -36 kD, aunque se ha observado que la proteína RG1 expresada bacteriamente, RG1 expresada por BHK y RG1 expresada por LNCaP migran a -45 kD en PAGE (L, fracciones 6-9).

Figura 7: tinción inmunohistoquímica de expresión de RG1 en tejidos prostáticos humanos. Se obtuvieron tejidos prostáticos a través del departamento de urología de la Stanford University School of Medicine. La tinción se llevó a cabo utilizando el kit Vector ABC-AP (AK5002). La tinción se visualizó con un kit de substrato Vector Red (SK-5100) y se contratiñó con hematoxilina. Los resultados muestran una intensa tinción periluminal de la membrana en las formaciones glandulares.

## Descripción detallada de la invención

### Definiciones

Tal como se utilizan en la descripción, los ejemplos y las reivindicaciones adjuntas, a menos que se especifique lo contrario, los siguientes términos tienen el significado indicado.

“RG1” se refiere al polipéptido que presenta la secuencia de aminoácidos indicada en la figura 2 (SEC ID n°: 2); variantes, análogos, derivados y fragmentos del mismo, y fragmentos de las variantes, análogos y derivados. Los términos “fragmento”, “derivado” y “análogo”, cuando se refieren al polipéptido de la figura 2 (SEC ID n°: 2), se refieren a un polipéptido que retiene esencialmente la misma actividad biológica y/o inmunológica que el polipéptido de la figura 2 (SEC ID n°: 2).

“*rg1*” se refiere al polinucleótido que presenta la secuencia indicada en la figura 1 (SEC ID n°: 1) y a los polinucleótidos que codifican polipéptidos que presentan la secuencia de aminoácidos de RG1 indicada en la figura 2 (SEC ID n°: 2); y a polinucleótidos que codifican variantes, análogos, derivados y fragmentos de RG1, y fragmentos de dichas variantes, análogos y derivados. *Rg1* también se refiere a polinucleótidos compuestos de ARN, así como a polinucleótidos que son el complemento de los polinucleótidos que codifican la secuencia de polipéptidos indicada en la figura 2 (SEC ID n°: 2).

“Polinucleótido” o “polinucleótidos” se refiere generalmente a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificados o ARN o ADN modificados. Así, por ejemplo, el término “polinucleótido” tal como se utiliza en el presente documento se refiere, entre otros, a ADN de cadena simple y de cadena doble, a ADN que es la mezcla de regiones de cadena simple y de cadena doble, ARN de cadena simple y de cadena doble, y ARN que es una mezcla de regiones de cadena simple y de cadena doble, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser de cadena simple o, más típicamente, de cadena doble, una mezcla de regiones de cadena simple y de cadena doble. Además, el término “polinucleótido” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a regiones de cadena simple que comprenden ARN o ADN, o ARN y ADN. Las cadenas en dichas regiones pueden proceder de la misma molécula o de moléculas diferentes. Las regiones pueden incluir toda una molécula o moléculas, pero más típicamente incluyen únicamente una región de algunas de las moléculas. A menudo, una de las moléculas de una región de triple hélice es un oligonucleótido.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “polinucleótido” incluye ADN o ARN tal como se ha descrito anteriormente que contiene una o más bases modificadas. De este modo, ADN o ARN con el esqueleto modificado por motivos de estabilidad o por otras razones son “polinucleótidos” en el sentido del término indicado en la presente

memoria. Además, ADN o ARN que comprenden bases poco habituales, como inosina, o bases modificadas, tales como bases marcadas con tritio, por nombrar dos ejemplos, son polinucleótidos en el sentido del término indicado en la presente memoria.

Se apreciará que se han introducido una gran variedad de modificaciones en el ADN y ARN que sirven a muchos propósitos útiles conocidos por los expertos en la materia. El término “polinucleótido”, tal como se utiliza en la presente memoria, incluye dichas formas de polinucleótidos química, enzimática o metabólicamente modificadas, así como las formas químicas de ADN y ARN características de los virus y las células, incluyendo células simples y complejas, entre otros.

“Polipéptidos”, tal como se utiliza en la presente memoria, incluye todos los polipéptidos tal como se describen a continuación. La estructura básica de los polipéptidos es bien conocida y ha sido descrita en innumerables manuales y otras publicaciones de la técnica. En este contexto, el término se utiliza en la presente memoria para hacer referencia a cualquier péptido o proteína que comprende dos o más aminoácidos enlazados entre sí en una cadena lineal mediante enlaces peptídicos. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término se refiere tanto a cadenas cortas, designadas también comúnmente en la técnica péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, cadenas largas, designadas generalmente en la técnica proteínas, de las cuales existen muchos tipos.

Se apreciará que a menudo los polipéptidos contienen aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos designados comúnmente como los 20 aminoácidos de procedencia natural, y que muchos aminoácidos, incluyendo los aminoácidos terminales, pueden ser modificados en un polipéptido determinado, ya sea mediante procesos naturales, tales como glicosilación y otras modificaciones postraduccion, o mediante técnicas de modificación química bien conocidas en la técnica. Incluso las modificaciones comunes que tienen lugar de forma natural en los polipéptidos son demasiado numerosas para ser indicadas exhaustivamente en la presente memoria, pero las mismas están bien descritas en textos básicos y monográficos más detallados, así como en la voluminosa bibliografía de investigación, y son bien conocidas por los expertos en la materia. Entre las modificaciones conocidas que pueden estar presentes en los polipéptidos según la presente invención se encuentran, por mencionar algunos ejemplos, la acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, enlazamiento covalente de flavina, enlazamiento covalente de un resto hemo, enlazamiento covalente de un polinucleótido o derivado de polinucleótido, enlazamiento covalente de un lípido o derivado lipídico, enlazamiento covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclización, formación de enlace disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, gammacarboxilación, glicación, glicosilación, formación de anclaje GPI, hidroxilación, yodinación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfación, adición de aminoácidos mediada por ARN de transferencia a proteínas, tal como arginilación y ubiquitinación.

Dichas modificaciones son bien conocidas por los expertos en la materia y han sido descritas con gran detalle en la bibliografía científica. Diversas modificaciones particularmente comunes, por ejemplo glicosilación, enlazamiento lipídico, sulfación, gammacarboxilación de residuos de ácido glutámico, hidroxilación y ADP-ribosilación, por ejemplo, han sido descritas en muchos textos básicos, como por ejemplo I. E. Creighton, *Proteins-Structure and Molecular Properties*, 2ª ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York, 1993. Existen muchos estudios detallados a propósito de esta cuestión, como por ejemplo Wold. F., en *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, pp 1-12, 1983; Seifter *et al*, *Met. Enzymol.* 182: 626-646, 1990 y Rattan *et al*, *Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging*, Ann. N. Y. Acad. Sci. 663: 48-62, 1992.

Se apreciará, tal como es bien conocido y tal como se ha indicado anteriormente, en los polipéptidos no son siempre completamente lineales. Por ejemplo, los polipéptidos pueden ser ramificados a consecuencia de una ubiquitinación, y pueden ser circulares, con o sin ramificación, generalmente a consecuencia de fenómenos postraduccion, incluyendo fenómenos de procesamiento natural y fenómenos provocados aproximadamente por manipulación humana que no tienen lugar de forma natural. Los polipéptidos circulares, ramificados y ramificados circulares también se pueden sintetizar mediante procedimientos naturales de no traducción y mediante métodos enteramente sintéticos.

Se pueden introducir modificaciones en cualquier punto de un polipéptido, incluyendo el esqueleto peptídico, las cadenas laterales de aminoácidos y los terminales amino o carboxilo. De hecho, el bloqueo del grupo amino o carboxilo en un polipéptido, o el bloqueo de ambos, mediante una modificación covalentes, es común en polipéptidos de procedencia natural y polipéptidos sintéticos, y dichas modificaciones pueden estar presentes también en los polipéptidos según la presente invención. Por ejemplo, el residuo de terminal amino de los polipéptidos preparados en *E. coli*, antes del procesamiento proteolítico, será casi invariablemente N-formilmetionina.

Las modificaciones que tengan lugar en un polipéptido estarán a menudo en función de cómo se prepara el mismo. por ejemplo, en los polipéptidos preparados expresando un gen clonado en un huésped, la naturaleza y extensión de las modificaciones vendrá determinada en gran medida por la capacidad de modificación postraduccion de la célula huésped y de las señales de modificación presentes en la secuencia de aminoácidos del polipéptido. por ejemplo, tal como es bien conocido, a menudo la glicosilación no tiene lugar en huéspedes bacterianos tales como *E. coli*. Correspondientemente, cuando se desea llevar a cabo una glicosilación, se debe expresar un polipéptido en un huésped glicosilante, generalmente una célula eucariota. A menudo las células de insectos llevan a cabo las mismas glicosilaciones postraduccion que las células de mamíferos y, por este motivo, se han desarrollado sistemas de expresión de células de insectos a efectos expresar eficazmente proteínas de mamíferos que presentan patrones nativos de glicosilación, entre otros. Se aplican consideraciones similares a otras modificaciones.

Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo grado o en grado variable en diversos sitios de un determinado polipéptido. Además, un determinado polipéptido puede contener muchos tipos de modificaciones.

5 En general, tal como se utiliza en la presente memoria, el término polipéptido comprende todas estas modificaciones, particularmente las que están presentes en los polipéptidos sintetizados expresando un polinucleótido en una célula huésped.

10 La expresión “polinucleótido que codifica un polipéptido”, tal como se utiliza en la presente memoria, comprende polinucleótidos que incluyen una secuencia que codifica un polipéptido según la presente invención, particularmente el polipéptido RG1 que presenta la secuencia de aminoácidos indicada en la figura 2 (SEC ID n°: 2). El término comprende polinucleótidos que incluyen una región continua individual o regiones discontinuas que codifican el polipéptido (por ejemplo, interrumpidas por intrones) junto con regiones adicionales.

15 La expresión “actividad biológica” se refiere a las funciones estructurales, reguladoras o bioquímicas del polipéptido RG1 de procedencia natural.

20 La expresión “actividad inmunológica” se refiere a la capacidad del RG1 natural, recombinante o sintético, o de cualquier fragmento del mismo, para inducir una determinada respuesta inmune en animales o células apropiados y enlazarse a anticuerpos específicos.

25 El término “oligonucleótido” u “oligonucleótidos” se refiere a polinucleótidos relativamente cortos. A menudo el término se refiere a desoxirribonucleótidos de cadena simple, pero también se puede referir a ribonucleótidos de cadena simple o de cadena doble, a híbridos ARN:ADN y a ADN de doble cadena, entre otros. A menudo los oligonucleótidos, tales como oligonucleótidos de sonda de ADN de cadena simple, se sintetizan mediante métodos químicos, tales como los implementados en sintetizadores automáticos de oligonucleótidos. Sin embargo, los oligonucleótidos se pueden preparar mediante una variedad de métodos distintos, incluyendo técnicas mediadas por ADN recombinante *in vitro* y mediante expresión de ADN en células y organismos. El término “oligonucleótidos” u “oligómeros”, o “fragmento”, “parte” o “segmento” de polinucleótido se refiere a una secuencia de polinucleótido de como mínimo, 30 aproximadamente, 10 nucleótidos y hasta aproximadamente 60 nucleótidos, preferentemente de aproximadamente 15 a 30 nucleótidos, y más preferentemente de aproximadamente 20 a 25 nucleótidos. El término “RG1 de procedencia natural” se refiere a RG1 producido por células humanas no modificadas genéticamente y contempla específicamente diversas formas de RG1 surgidas de modificaciones postraduccion del polipéptido, incluyendo, sin limitarse a las mismas, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación, acilación y escisión.

35 El término “variante” o “variantes” de polinucleótidos o polipéptidos, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a polinucleótidos o polipéptidos que difieren de un polinucleótido o polipéptido de referencia, respectivamente. En este sentido, dichas variantes se describen a continuación y en otros puntos de la presente descripción con mayor detalle.

40 (1) Un polinucleótido que difiere en secuencia de polinucleótido de otro polinucleótido de referencia. Generalmente, las diferencias son limitadas, de tal modo que las secuencias de polinucleótidos de la referencia y la variante son muy similares en conjunto y, en muchas regiones, idénticas.

45 Tal como se indica a continuación, los cambios en la secuencia de polinucleótido de la variante pueden ser silentes. Es decir, los mismos pueden no alterar los aminoácidos codificados por dicho polinucleótido. En el caso en que las modificaciones se limiten a cambios silentes de este tipo, una variante codificará un polipéptido con la misma secuencia de aminoácidos que la referencia. Además, tal como se indica continuación, los cambios en la secuencia de polinucleótido de la variante pueden alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia. Estos cambios en el polinucleótido pueden comportar sustituciones, adiciones, eliminaciones, fusiones y truncaciones de aminoácidos en el polipéptido codificado por la secuencia de referencia, tal como se describe a continuación.

50 (2) Un polipéptido que difiere en la secuencia de aminoácidos de otro polipéptido de referencia. Generalmente, las diferencias son limitadas, de tal modo que las secuencias de la referencia y la variante son muy similares en conjunto y, en muchas regiones, idénticas. Un polipéptido variante y un polipéptido de referencia pueden diferir en la secuencia de aminoácidos en una o más sustituciones, adiciones, eliminaciones, fusiones y truncaciones, que se pueden presentar en cualquier combinación. Se pueden sintetizar o seleccionar variantes recombinantes que codifican estos mismos polipéptidos o polipéptido similares utilizando la “redundancia” 60 en el código genético.

Se pueden introducir diversas sustituciones de codón, tales como los cambios silentes que producen diversos sitios de restricción, a efectos de optimizar la clonación en un plásmido o vector viral o expresión en un sistema procariota o eucariota particular. También se pueden introducir mutaciones a efectos de modificar las propiedades del polipéptido, 65 alterar las afinidades de enlazamiento de ligandos, las afinidades entre cadenas, o la velocidad de degradación del polipéptido o “recombinación”.

La expresión “variante alélica” se refiere a una forma alternativa del polinucleótido *rg1*. Los alelos resultan de una mutación, es decir, una modificación en la secuencia de polinucleótido, y generalmente producen ARNm alterados o polipéptidos cuya estructura o función pueden estar alteradas o no. Cualquier gen determinado puede presentar ninguna, una o muchas formas alélicas. Los cambios mutacionales comunes que dan lugar a alelos se atribuyen generalmente a eliminaciones, adiciones o sustituciones naturales de nucleótidos. Cada uno de estos tipos de cambios puede tener lugar individualmente o en combinación con los otros, o puede tener lugar una o más veces en una determinada secuencia.

El término “derivado” se refiere a polinucleótidos o polipéptidos derivados de *rg1* o RG1 de procedencia natural, respectivamente, mediante modificaciones químicas, tales como ubiquitinación, marcación (por ejemplo, radionucleidos, diversas modificaciones enzimáticas), pegilación (derivación con polietilenglicol) o mediante inserción o sustitución de aminoácidos tales como ornitina (o sustitución de los nucleótidos que codifican un aminoácido de este tipo), que no tienen lugar normalmente en proteínas humanas.

El término “eliminación” se define como un cambio en las secuencias de polinucleótido o de aminoácidos en el que están ausentes uno o más polinucleótidos o residuos aminoácido, respectivamente.

Una “inserción” o “adición” es un cambio en una secuencia de polinucleótido o de aminoácidos que ha comportado la adición de uno o más polinucleótidos o residuos aminoácido, respectivamente, en comparación con la secuencia de polinucleótido o la secuencia de aminoácidos de procedencia natural.

Una “sustitución” tiene lugar tras el reemplazo de uno o más polinucleótidos o aminoácidos por diferentes polinucleótidos o aminoácidos, respectivamente.

Preferentemente, las sustituciones de aminoácidos son el resultado de reemplazar un aminoácido con otro aminoácido con propiedades estructurales y/o químicas similares, tal como el reemplazo de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, o una treonina con una serina, es decir un reemplazo conservativo de aminoácidos. Típicamente, las inserciones o eliminaciones son del orden de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida se puede determinar experimentalmente realizando sistemáticamente inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos en el polipéptido utilizando técnicas de ADN recombinante y analizando la actividad de las variantes recombinantes resultantes.

Un “fragmento” es un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que es enteramente la misma que parte, pero no toda, la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos RG1 mencionados anteriormente y variantes o derivados de los mismos.

Un “fragmento”, una “parte” o un “segmento” de polipéptido es una cadena de residuos aminoácidos de como mínimo aproximadamente 5 aminoácidos, frecuentemente de por lo menos aproximadamente 7 aminoácidos, típicamente de por lo menos aproximadamente 9 a 13 aminoácidos, y en diversas formas de realización de por lo menos aproximadamente 17 o más aminoácidos.

“Recombinante” o “molécula de ADN recombinante” se refiere a una secuencia de polinucleótido que no tiene procedencia natural o surge de la combinación artificial de dos segmentos de secuencia de otro modo separados. La expresión “producido recombinantemente” se refiere a una combinación artificial frecuentemente llevada a cabo por medio de síntesis química, o mediante la manipulación artificial de segmentos aislados de polinucleótidos, por ejemplo, mediante técnicas de ingeniería genética. Habitualmente, dicha manipulación se lleva a cabo a efectos de sustituir un codón con un codón redundante que codifica el mismo aminoácido o un aminoácido conservativo, a la vez que típicamente se introduce o se elimina un sitio de reconocimiento de secuencia. Alternativamente, se unen segmentos de polinucleótido con las funciones deseadas a efectos de generar una única entidad genética que comprende una combinación deseada de funciones que no se encuentra en las formas comunes naturales. Se pueden incorporar mediante el diseño sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, secuencias de regulación, secuencias de control u otras características útiles. La expresión “moléculas de ADN recombinante” incluye clonación y vectores de expresión. El término “recombinante” también se puede referir a un polinucleótido que codifica un polipéptido y se prepara utilizando técnicas de ADN recombinante.

El término “aislado” se refiere a modificado “por la mano del hombre” desde su estado natural, es decir que, si está presente en la naturaleza, se ha modificado o eliminado de su entorno original, o ambas cosas. Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido de procedencia natural o un polipéptido presente de forma natural en un animal vivo en su estado natural no es “aislado”, pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de los materiales que coexisten en su estado natural sí que es “aislado”, tal como dicho término se utiliza en la presente memoria. Por ejemplo, en lo que se refiere a polinucleótidos, el término aislado se refiere a que el mismo está separado del cromosoma y la célula en los que se encuentra de forma natural.

Los polinucleótidos y polipéptidos pueden estar presentes en una composición, tal como formulaciones de medio, soluciones para la introducción de polinucleótidos o polipéptidos, por ejemplo, en células, composiciones o soluciones para llevar a cabo reacciones químicas o enzimáticas, por ejemplo, que no son composiciones de procedencia natural, y en las mismas permanecen aislados polinucleótidos o polipéptidos dentro del significado de dicho término tal como se utiliza el presente documento.



Las expresiones “sustancialmente puro” y “sustancialmente homogéneo” se utilizan indistintamente y describen un polipéptido RG1, o fragmentos del mismo, o un segmento de polinucleótido que lo codifica, en el que dicho polipéptido o polinucleótido está separado de los componentes que lo acompañan de forma natural. Un polipéptido RG1 o fragmento del mismo, un segmento de ADN que lo codifica, está sustancialmente libre de componentes asociados naturalmente cuando se separa de los contaminantes nativos que lo acompañan en su estado natural. De este modo, un polipéptido sintetizado químicamente o sintetizado en un sistema celular diferente de la célula en la que se origina de forma natural está sustancialmente libre de sus componentes asociados naturalmente. Similarmente, un polinucleótido sintetizado químicamente o sintetizado en un sistema celular diferente de la célula en la que se origina de forma natural está sustancialmente libre de sus componentes asociados naturalmente.

El término “homólogo”, cuando se utiliza para describir un polinucleótido, indica que dos polinucleótidos, o secuencias designadas de los mismos, cuando se alinean y comparan óptimamente, son idénticos, con inserciones o eliminaciones apropiadas de nucleótidos en por lo menos el 70% de los nucleótidos, habitualmente de aproximadamente 75% a 99%, y más preferentemente por lo menos de aproximadamente 98 a 99% de los nucleótidos.

El término “similitud”, cuando se utiliza para describir un polipéptido, se determina comparando la secuencia de aminoácidos y los sustitutos conservados de aminoácidos de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido.

El término “reacción en cadena de la polimerasa” o “PCR” se refiere a un procedimiento en el que se amplifican fragmentos específicos de ADN, tal como se describe en la patente US nº 4.683.195, publicada el 28 de julio de 1987. Generalmente, se requiere información de secuencia de los extremos del fragmento de polipéptido de interés o de más allá, de tal modo que se puedan diseñar cebadores de oligonucleótidos; dichos cebadores apuntarán el uno hacia el otro, y serán idénticos o similares en secuencia a las cadenas opuestas de la plantilla que se pretende amplificar. Los 5 nucleótidos terminales de los dos cebadores coincidirán con los extremos del material amplificado. La PCR se puede utilizar para amplificar secuencias específicas de ADN a partir de ADN, ADNc total genómico transcrito a partir de ARN total celular, secuencias de plásmido, etc. (véase generalmente Mullis *et al*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51: 263,1987; Erlich, ed., PCR Technology, Stockton Press, NY, 1989). Las condiciones “rigurosas” tienen lugar típicamente en un intervalo comprendido desde aproximadamente la  $T_m$  (temperatura de fusión) -5°C (5° por debajo de la  $T_m$  de la sonda) a aproximadamente de 20°C a 25°C por debajo de la  $T_m$ . Tal como apreciarán los expertos en la materia, una hibridización rigurosa se puede utilizar a efectos de identificar o detectar secuencias idénticas de polinucleótido o a efectos de identificar o detectar secuencias de polinucleótidos similares o relacionadas. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “condiciones rigurosas” significa que la hibridización tendrá lugar únicamente si existe como mínimo un 95%, y preferentemente como mínimo un 97%, de identidad entre las secuencias.

El término “hibridización”, tal como se utiliza en la presente memoria, puede incluir “cualquier procedimiento por el que una cadena de polinucleótido se une a una cadena complementaria por emparejamiento de bases” (Coombs, J., Dictionary of Biotechnology, Stockton Press, Nueva York, N.Y., 1994).

La expresión “dosis terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de polipéptido o de sus anticuerpos, antagonistas o inhibidores, incluyendo moléculas antisentido y ribozimas, que mejoran los síntomas o las condiciones de una enfermedad. La eficacia terapéutica y la toxicidad de estos compuestos se puede determinar mediante procedimientos farmacológicos estándar. En cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo,  $ED_{50}$  (la dosis terapéuticamente efectiva en un 50% de la población) y  $LD_{50}$  (la dosis letal en un 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos terapéutico y tóxico es el índice terapéutico, y se puede expresar como el cociente  $ED_{50}/LD_{50}$ .

Los términos “tratar” o “tratamiento”, tal como se utilizan en la presente memoria, comprenden el tratamiento de un estado de enfermedad en un paciente humano asociado al crecimiento de tumor prostático, e incluye estados de enfermedad en los que el paciente requiere niveles disminuidos de RG1.

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a nuevos polipéptidos RG1, polinucleótidos *rg1* y anticuerpos dirigidos hacia polipéptidos RG1, entre otras cosas, tal como se describe a continuación con mayor detalle. En particular, la presente invención se refiere a nuevos polipéptidos RG1 y a los polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos RG1, y se refiere particularmente a RG1 que presenta la secuencia de aminoácidos indicada en la figura 2 (SEC ID nº: 2) y a *rg1* que presentan la secuencia de polinucleótido indicada en la figura 1 (SEC ID nº: 1). La presente invención también comprende variantes de RG1. Una variante preferente de RG1 es una variante que presenta por lo menos un 70% de similitud (preferentemente como mínimo un 70% de identidad) con respecto a la secuencia de polipéptido mostrada en la figura 2 (SEC ID nº: 2), y más preferentemente por lo menos un 90% de similitud (más preferentemente por lo menos un 90% de identidad) con respecto al polipéptido mostrado en la figura 2 (SEC ID nº: 2), y aún más preferentemente por lo menos un 95% de similitud (todavía más preferentemente por lo menos un 95% de identidad) con respecto a la secuencia de polipéptido mostrada en la figura 2 (SEC ID nº: 2), y también incluye partes de dichos polipéptidos, generalmente con dicha parte del polipéptido conteniendo por lo menos 30 aminoácidos, y más preferentemente por lo menos 50 aminoácidos.

La secuencia codificadora del polipéptido RG1 empieza con 296 pares de bases desde el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1 (SEC ID n°: 1). RG1 contiene tres dominios estructurales característicos de la superfamilia Mindin/F-spondin de proteínas de matriz extracelular: dos dominios de spondin (FS1 y FS2), que comprenden los aminoácidos 31 a 103 y 138 a 221, respectivamente, y un dominio de tromboespondina, que comprende los aminoácidos 278 a 330.

La presente invención se basa en parte en la homología estructural mostrada en la figura 3 entre RG1 y Mindin de rata, otro miembro de la familia de proteínas de matriz extracelular. La secuencia de aminoácidos de RG1 es aproximadamente un 89,7% similar a Mindin de rata.

La presente invención también se basa en parte en el perfil de expresión de RG1, tal como demuestra su expresión en bibliotecas de tejido prostático y su sobreexpresión en bibliotecas de tumor prostático. Este perfil de tejido se observa en el análisis de expresión de ARNm en muestras de tejido procedentes de tejidos normales y tumorales por análisis de Taqman basado en PCR. Este procedimiento de análisis ha demostrado que el ARNm que codifica RG1 está sobreexpresado en los tejidos prostáticos en comparación con otros tejidos.

### Polinucleótidos

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se dan a conocer polinucleótidos aislados que codifican el polipéptido RG1 que presenta la secuencia de aminoácidos deducida de la figura 2 (SEC ID n°: 2).

Utilizando la información proporcionada en la presente memoria, tal como la secuencia de polinucleótido indicada en la figura 1 (SEC ID n°: 1), un polinucleótido según la presente invención que codifica un polipéptido RG1 se puede obtener utilizando clonación estándar y procedimientos de barrido, tales como los utilizados para clonar ADNc utilizando ARNm procedente de células de tejido humano como material de partida. Como ilustración de la presente invención, la secuencia de polinucleótido de la figura 1 (SEC ID n°: 1) se encontró en clones de ADNc obtenidos a partir de tejidos prostáticos humanos. *Rgl* se identificó como un gen expresado en la próstata consultando la base de datos Incyte LifeSeq. La secuencia de nucleótidos se identificó mediante una búsqueda de anotación de la base de datos utilizando la herramienta "Protein Function" proporcionada por Incyte con el objetivo de buscar en la base de datos. La secuencia de nucleótidos se encontró en la categoría de moléculas de adhesión celular en la base de datos anotada y se describió como un homólogo de F-spondin. El análisis Northern electrónico de la distribución de secuencias de polinucleótidos *rgl* en el conjunto de bibliotecas de la base de datos puso de manifiesto que *rgl* se expresa en niveles elevados en las bibliotecas prostáticas y en niveles menores en cierto número de otras bibliotecas de tejidos, incluyendo las de tejidos normales y tumorales.

Tras la disposición del conjunto de clones *rgl* de la base de datos en una secuencia contigua de polinucleótidos, y evitando la secuencia contigua, se identificó una secuencia de codificación de longitud completa en el polinucleótido ensamblado predicho. Dicha secuencia codifica una proteína con homología con mindin de rata.

Se obtuvieron los clones Incyte 1640796, 1712252, y 1880265 a través de Incyte para el trabajo experimental y se identificó que el clon 3360733 contenía la mayoría de secuencia de nucleótidos 5'. Dicho clon se secuenció completamente, y contenía la secuencia de codificación completa para la proteína RG1 predicha. Dicha secuencia está representada en la figura 1 (SEC ID n°: 1).

Los polinucleótidos según la presente invención se pueden encontrar en forma de ARN, tal como ARNm, o en forma de ADN, incluyendo, por ejemplo, ADNc y ADN genómico obtenido por clonación, o preparado mediante técnicas de síntesis química, o mediante una combinación de las mismas, o mediante métodos descritos en la presente memoria. El ADN puede ser de doble cadena o de cadena simple. El ADN de cadena simple puede ser la cadena codificadora, también conocida como cadena sentido, o puede ser la cadena no codificadora, también designada cadena antisentido.

La secuencia que codifica el polipéptido puede ser idéntica a la secuencia codificadora del polinucleótido mostrado en la figura 1 (SEC ID n°: 1). También puede ser un polinucleótido con una secuencia diferente que, como resultado de la redundancia (degeneración) del código genético, codifica el polipéptido de la figura 2 (SEC ID n°: 2).

Los polinucleótidos según la presente invención que codifican el polipéptido de la figura 2 (SEC ID n°: 2) pueden incluir, sin limitarse a los mismos, la secuencia codificadora para el propio polipéptido, la secuencia codificadora del polipéptido, junto con secuencias adicionales no codificadoras, incluyendo, por ejemplo, aunque sin limitarse a los mismos, intrones y secuencias 5 y 3 no codificadoras, tal como las secuencias transcritas, no traducidas, que tienen un papel en la transcripción, secuencias de procesamiento de ARNm (por ejemplo, señales de empalme y de poliadenilación) o secuencias codificadoras adicionales que codifican aminoácidos adicionales, tales como los que proporcionan funcionalidades adicionales. Así, por ejemplo, el polipéptido se puede fusionar con una secuencia marcadora, tal como un péptido, que facilita la purificación del polipéptido fusionado. En algunas formas de realización preferidas de este aspecto de la presente invención, la secuencia marcadora es un péptido de hexahistidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pTrcHisB (Invitrogen, Carlsbad, CA) entre otros, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Tal como se describe en Gentz *et al* (Proc. Natl. Acad. Sci., USA 86: 821-824, 1989), por ejemplo, la hexahistidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión.

Los polinucleótidos pueden codificar un polipéptido constituido por el polipéptido más aminoácidos adicionales de terminal amino o carboxilo, o aminoácidos interiores del polipéptido (cuando la forma activa presenta más de una cadena de polipéptido, por ejemplo). Dichas secuencias pueden tener un papel en el procesamiento de un polipéptido desde el precursor a la forma final, pueden facilitar el tráfico de polipéptidos, pueden prolongar o acortar la vida media del polipéptido o pueden facilitar la manipulación de un polipéptido para el ensayo o la producción, entre otras cosas. Tal como acostumbra a ser el caso *in situ*, los aminoácidos adicionales se pueden tratar separados del polipéptido mediante enzimas proteolíticas.

La presente invención se refiere además a variantes de los polinucleótidos descritos anteriormente en la presente memoria que codifican fragmentos, análogos y derivados del polipéptido que presentan la secuencia de aminoácidos deducida de la figura 2 (SEC ID n°: 2). Una variante del polinucleótido puede ser una variante de procedencia natural, tal como una variante alélica de procedencia natural, o puede ser una variante cuya existencia en la naturaleza no se conozca. Dichas variantes de procedencia no natural del polinucleótido se pueden preparar mediante técnicas de mutagénesis, incluyendo las que se aplican a polinucleótidos, células u organismos.

En este sentido, las variantes son variantes que difieren de los polinucleótidos mencionados anteriormente por sustituciones, eliminaciones o adiciones de polinucleótidos. Las sustituciones, eliminaciones o adiciones pueden comprender uno o más polinucleótidos. Las variantes pueden ser modificadas en las regiones codificadoras o no codificadoras, o en ambas. Las modificaciones de las regiones codificadoras pueden conllevar sustituciones, eliminaciones o adiciones de aminoácidos conservativas o no conservativas.

En este sentido, entre las formas de realización particularmente preferidas de la presente invención se encuentran los polinucleótidos que codifican polipéptidos que presentan la secuencia de aminoácidos de RG1 indicada en la figura 2 (SEC ID n°: 2); variantes, análogos, derivados y fragmentos de los mismos, y fragmentos de dichas variantes, análogos y derivados.

En este sentido, resultan además particularmente preferidos los polinucleótidos que codifican variantes, análogos, derivados y fragmentos de RG1, y variantes, análogos y derivados de dichos fragmentos, que presentan la secuencia de aminoácidos del polipéptido RG1 de la figura 2 (SEC ID n°: 2) en los que diversos, unos pocos, de 5 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, 2, 1, o ningún residuo aminoácido se sustituye, elimina o añade, en cualquier combinación. Entre estas modificaciones, resultan particularmente preferidas las sustituciones, adiciones y eliminaciones silentes, que no modifican las propiedades y actividades del polipéptido RG1. En este sentido, resultan también particularmente preferentes las sustituciones conservativas. Son muy particularmente preferidos los polinucleótidos que codifican polipéptidos que presentan la secuencia de aminoácidos de la figura 2 (SEC ID n°: 2) sin sustituciones.

Otras formas de realización preferidas de la presente invención son polinucleótidos que son por lo menos un 70% idénticos a un polinucleótido que codifica el polipéptido RG1 que presenta la secuencia de aminoácidos indicada en la figura 2 (SEC ID n°: 2), y polinucleótidos complementarios a dichos polinucleótidos. Alternativamente, son muy preferentes los polinucleótidos que comprenden una región que es por lo menos un 80% idéntica a un polinucleótido que codifica el polipéptido RG1 y polinucleótidos complementarios a los mismos. En este sentido, son particularmente preferentes los polinucleótidos que son como mínimo un 90% idénticos al mismo, y entre estos polinucleótidos particularmente preferidos, son muy especialmente preferidos los que son por lo menos un 95% idénticos. Además, los que son por lo menos un 97% idénticos son muy preferidos entre los que son por lo menos un 95% idénticos, y entre estos, los que son por lo menos un 98% y por lo menos un 99% idénticos, son particularmente muy preferentes, siendo los más preferentes los que son por lo menos un 99% idénticos.

En este aspecto, son además formas de realización particularmente preferidas los polinucleótidos que codifican polipéptidos que retienen sustancialmente la misma actividad biológica que el polipéptido codificado por la secuencia de polinucleótido de la figura 1 (SEC ID n°: 1).

La presente invención se refiere además a polinucleótidos que se hibridizan a las secuencias descritas anteriormente en la presente memoria. En este sentido, la presente invención se refiere particularmente a polinucleótidos que se hibridizan en condiciones rigurosas a los polinucleótidos descritos anteriormente en la presente memoria.

Tal como se ha descrito además con respecto a los ensayos de polinucleótidos según la presente invención, por ejemplo, los polinucleótidos según la invención tal como se han descrito anteriormente pueden ser utilizados como sondas de hibridización para ADNc y ADN genómico a efectos de aislar ADNc de cadena completa y clones genómicos que codifican RG1, y a efectos de aislar ADNc y clones genómicos de otros genes que presentan una elevada similitud de secuencia con respecto al gen *rg1*. Generalmente, dichas sondas comprenderán por lo menos 15 bases. Preferentemente, dichas sondas presentan por lo menos 30 bases, y pueden tener por lo menos 50 bases.

Por ejemplo, la región codificadora del gen *rg1* se puede aislar mediante videotecas de barrido utilizando sondas de oligonucleótidos sintéticas diseñadas utilizando la secuencia de ADN conocida. Por ejemplo, se puede utilizar un oligonucleótido marcado con una secuencia complementaria a la de un polinucleótido según la presente invención a efectos de realizar un barrido de una biblioteca de ADNc o ADN genómico a efectos de identificar clones que se hibridizan con la sonda.

En resumen, un polinucleótido según la presente invención puede codificar un polipéptido o un polipéptido más una secuencia guía (que se puede designar prepolipéptido).

Se apreciará que la presente invención también se refiere, entre otros, a polinucleótidos que codifican los fragmentos de polipéptido, a polinucleótidos que se hibridizan con polinucleótidos que codifican fragmentos de polipéptido, particularmente los que se hibridizan en condiciones rigurosas, y a polinucleótidos, tales como cebadores PCR, para amplificar polinucleótidos que codifican fragmentos de polipéptido. En este sentido, son polinucleótidos preferentes los que corresponden a fragmentos de polipéptido preferentes, tal como se describe a continuación.

#### 10 *Polipéptidos*

La presente invención se refiere además a un polipéptido RG1 que presenta la secuencia de aminoácidos deducida de la figura 2 (SEC ID n°: 2).

La presente invención también se refiere a fragmentos, análogos y derivados de dichos polipéptidos. Los términos fragmento, derivado y análogo, cuando se refiere al polipéptido de la figura 2 (SEC ID n°: 2), se refieren a un polipéptido que retiene esencialmente la misma actividad biológica que un polipéptido de este tipo.

El polipéptido según la presente invención puede ser un polipéptido recombinante, un polipéptido natural o un polipéptido sintético. En ciertas formas de realización preferidas, el mismo es un polipéptido recombinante.

El fragmento, derivado o análogo del polipéptido de la figura 2 (SEC ID n°: 2) puede ser (i) uno en el que uno o más de los residuos aminoácido se sustituyen por un residuo aminoácido conservado o no conservado (preferentemente, un residuo aminoácido conservado), y dicho residuo aminoácido sustituido puede ser o no un residuo codificado por el código genético, o (ii) uno en el que uno o más de los residuos aminoácido incluyen un grupo sustituyente, o (iii) uno en el que el polipéptido se fusiona con otro compuesto, tal como un compuesto a efectos de incrementar la vida media del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol), o (iv) uno en el que los aminoácidos adicionales están fusionados con el polipéptido, tal como una secuencia guía o secretora, o una secuencia que se utiliza para la purificación del polipéptido. Se considera que dichos fragmentos, derivados y análogos están comprendidos en el alcance de los expertos en la materia a partir de las descripciones incluidas en la presente memoria.

En este sentido, entre las formas de realización particularmente preferentes de la presente invención se encuentran polipéptidos que presentan la secuencia de aminoácidos de RG1 indicada en la figura 2 (SEC ID n°: 2), variantes, análogos, derivados y fragmentos de los mismos, y variantes, análogos y derivados de dichos fragmentos.

Entre las variantes preferidas se encuentran las que varían a partir de una referencia mediante sustituciones conservativas de aminoácidos. Dichas sustituciones son aquellas que sustituyen un determinado aminoácido en un polipéptido por otro aminoácido de características similares. Se consideran típicamente sustituciones conservativas los reemplazos, uno por otro, entre los aminoácidos alifáticos Ala, Val, Leu e Ile, el intercambio de los residuos hidroxilo Ser y Thr, el intercambio de los residuos ácidos Asp y Glut, la sustitución entre los residuos amídicos Asn y Gln, el intercambio de los residuos básicos Lys y Arg, y los reemplazos entre los residuos aromáticos Phe y Tyr.

En este sentido, resultan además particularmente preferentes las variantes, análogos, derivados y fragmentos, y las variantes, análogos y derivados de dichos fragmentos, que presentan la secuencia de aminoácidos de RG1 de la figura 2 (SEC ID n°: 2) en los que diversos, unos pocos, de 5 a 10, de 1 a 5, de 1 a 3, 2, 1, o ningún residuo aminoácido se sustituye, elimina o añade, en cualquier combinación. Entre estas modificaciones, resultan particularmente preferentes las sustituciones, adiciones y eliminaciones silentes, que no modifican las propiedades y actividades del polipéptido RG1. En este sentido, resultan también particularmente preferentes las sustituciones conservativas. Son muy particularmente preferentes los polipéptidos que presentan la secuencia de aminoácidos de la figura 2 (SEC ID n°: 2) sin sustituciones.

Los polipéptidos y polinucleótidos según la presente invención se proporcionan preferentemente en forma aislada, y preferentemente se purifican a homogeneidad.

Los polipéptidos según la presente invención también incluyen el polipéptido de la figura 2 (SEC ID n°: 2), así como polipéptidos que presentan como mínimo un 70% de similitud (preferentemente como mínimo un 70% de identidad) con respecto al polipéptido mostrado en la figura 2 (SEC ID n°: 2), y más preferentemente por lo menos un 90% de similitud (más preferentemente como mínimo un 90% de identidad) con respecto al polipéptido de la figura 2 (SEC ID n°: 2), y aún más preferentemente por lo menos un 95% de similitud (aún más preferentemente como mínimo un 95% de identidad) con respecto al polipéptido de la figura 2 (SEC ID n°: 2), y también incluye partes de dichos polipéptidos, generalmente con dicha parte del polipéptido conteniendo como mínimo 30 aminoácidos, y más preferentemente por lo menos 50 aminoácidos.

Tal como se conoce la técnica, el término “similitud” entre los polipéptidos se determina comparando la secuencia de aminoácidos y sus sustitutos aminoácidos conservados de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido.

Los fragmentos o partes de los polipéptidos según la presente invención se pueden utilizar para preparar los correspondientes polipéptidos de longitud completa mediante síntesis peptídica; en consecuencia, los fragmentos se pueden utilizar como intermediarios para preparar los polipéptidos de longitud completa.

## 5 *Fragmentos*

También entre las formas de realización preferidas de este aspecto de la presente invención se encuentran polipéptidos que comprenden fragmentos de RG1, más particularmente fragmentos del RG1 de la figura 2 (SEC ID nº: 2), y fragmentos de variantes y derivados del RG1 de la figura 2 (SEC ID nº: 2).

10

En este sentido, un fragmento es un polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que es completamente igual a parte, pero no la totalidad, de la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos RG1 mencionados anteriormente y variantes o derivados de los mismos.

15

Dichos fragmentos pueden ser “autónomos”, es decir no formar parte de otros aminoácidos o polipéptidos ni estar fusionados con los mismos, o pueden estar comprendidos dentro de un polipéptido mayor del cual constituyen una parte o región. Cuando están comprendidos dentro de un polipéptido mayor, los fragmentos descritos forman muy preferentemente una región individual continua. Sin embargo, diversos fragmentos pueden estar comprendidos dentro de un único polipéptido mayor. Por ejemplo, ciertas formas de realización preferidas se refieren a un fragmento de un polipéptido RG1 según la presente invención comprendido dentro de un polipéptido precursor diseñado para la expresión en un huésped y presentando regiones de prepolipéptido y propolipéptido heterólogas fusionadas al terminal amino del fragmento RG1 y una región adicional fusionada al terminal carboxilo del fragmento. En consecuencia, el término fragmentos, en un aspecto del significado pretendido en la presente memoria, se refiere a la parte o partes de un polipéptido de fusión o una proteína de fusión derivadas de RG1.

25

Como ejemplos representativos de fragmentos de polipéptidos según la presente invención, se pueden mencionar los que presentan de aproximadamente 25 a aproximadamente 331 aminoácidos.

30

En este contexto, “aproximadamente” incluye el intervalo particularmente mencionado e intervalos mayores o menores en diversos, unos pocos, 5, 4, 3, 2 ó 1 aminoácido en uno de los extremos o en los dos. Por ejemplo, en este contexto, aproximadamente 331 aminoácidos significa un fragmento de polipéptido de 25 más o menos diversos, unos pocos 5, 4, 3, 2 ó 1 residuos aminoácidos a 331 más o menos diversos, unos pocos 5, 4, 3, 2 ó 1 residuos aminoácidos, es decir, en intervalos tan amplios como de 25 menos diversos aminoácidos a 331 más diversos aminoácidos, o tan estrechos como de 25 más diversos aminoácidos a 331 menos diversos aminoácidos.

35

En este sentido, resultan particularmente preferidos los intervalos mencionados más o menos hasta 5 aminoácidos en uno o en los dos extremos. Resultan muy particularmente preferentes los intervalos mencionados más o menos hasta 3 aminoácidos en uno o en los dos extremos mencionados. Especialmente, son muy particularmente preferentes los intervalos más o menos 1 aminoácido en uno o en los dos extremos, o los intervalos mencionados sin adiciones ni sustracciones. En este sentido, lo más preferente son fragmentos de aproximadamente 25 a aproximadamente 331 aminoácidos.

40

Entre los fragmentos particularmente preferentes de la presente invención se encuentran mutantes de truncación de RG1. Los mutantes de truncación de RG1 incluyen variantes o derivados de la secuencia de la figura 2 (SEC ID nº: 2), excepto por la eliminación de una serie continua de residuos (es decir, una región, parte o porción continua) que incluye el terminal amino de la secuencia mostrada en la figura 2 (SEC ID nº: 2), o una serie continua de residuos que incluye el terminal carboxilo o, tal como en los mutantes de doble truncación, la eliminación de dos series continuas de residuos, una incluyendo el terminal amino y una incluyendo el terminal carboxilo. Los fragmentos que presentan los intervalos de tamaño indicados anteriormente son también formas de realización preferidas de fragmentos de truncación, que son particularmente preferentes entre los fragmentos en general.

50

En este aspecto de la presente invención, resultan particularmente preferidos los fragmentos caracterizados por los atributos biológicos y/o inmunológicos de RG1. Dichos fragmentos incluyen los que contienen los dominios estructurales predichos de RG1, que comprenden como mínimo los aminoácidos 31 a 103, 138 a 221 y 278 a 330, o aquellos fragmentos utilizados para generar anticuerpos, tales como los descritos en el ejemplo 4.

55

En este sentido, se indican ciertas regiones preferidas en la figura 2 (SEC ID nº: 2), e incluyen, sin limitarse a las mismas, regiones de los tipos mencionados anteriormente, identificadas por análisis de la secuencia de aminoácidos indicada en la figura 2 (SEC ID nº: 2).

60

En este sentido, entre los fragmentos muy preferidos se encuentran los que comprenden regiones de RG1 que combinan diversas características estructurales, tales como las características indicadas anteriormente. En este sentido, los dominios de spondin y el dominio de tromboespondina, que comprenden aproximadamente los aminoácidos 31 a 103, 138 a 221 y 278 a 330, respectivamente, que son característicos de la superfamilia Mindin/spondin de proteína de matriz extracelular, son regiones particularmente preferentes. Dichas regiones pueden estar comprendidas dentro de un polipéptido mayor o pueden ser en sí mismas un fragmento preferente según la presente invención, tal como se ha descrito anteriormente. Se apreciará que el término “aproximadamente”, tal como se utiliza en este párrafo, tiene el sentido indicado anteriormente con respecto a fragmentos en general.

65

Son además regiones preferidas las que median actividades de RG1. En este sentido, son muy particularmente preferentes los fragmentos que presentan una actividad química, biológica o de otro tipo propia de RG1, incluyendo los que presentan una actividad similar o una actividad mejorada, o con una actividad no deseada disminuida. en este sentido, son particularmente preferidos los fragmentos que contienen regiones que son homólogas en secuencia, o en posición, o en secuencia y posición, con respecto a las regiones activas de los polipéptidos mencionados, tales como las otras proteínas de la familia Mindin, que incluye RG1.

#### *Vectores, células huésped y sistemas de expresión*

La presente invención también se refiere a vectores que incluyen polinucleótidos según la presente invención, a células huésped diseñadas genéticamente con vectores según la presente invención, y a la producción de polipéptidos según la presente invención mediante técnicas recombinantes. Dichas técnicas se describen en Sambrook *et al*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., 1989 y Ausubel, F.M. *et al*, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y., 1989.

Las células huésped se pueden diseñar genéticamente con el fin de incorporar polinucleótidos y expresar polipéptidos según la presente invención. Por ejemplo, los polinucleótidos se pueden introducir en células huésped utilizando técnicas conocidas de infección, transducción, transfección, transvección y transformación. Los polinucleótidos se pueden introducir individualmente o con otros polinucleótidos. Dichos otros polinucleótidos se pueden introducir independientemente de los polinucleótidos según la presente invención, cointroducirse con los mismos o introducirse unidos a los mismos.

De este modo, por ejemplo, los polinucleótidos según la presente invención se pueden transfectar en células huésped con otro polinucleótido separado que codifica un marcador seleccionable, utilizando técnicas estándar para la cotransfección y la selección, por ejemplo, en células de mamíferos. En este caso, generalmente los polinucleótidos se incorporarán de forma estable al genoma de la célula huésped.

Alternativamente, los polinucleótidos pueden estar unidos a un vector que contiene un marcador seleccionable para la propagación en un huésped. El constructo del vector se puede introducir en células huésped mediante las técnicas mencionadas anteriormente. Generalmente, un vector de plásmido se introduce como ADN en un precipitado, tal como un precipitado de fosfato de calcio, o en un complejo con un lípido cargado. También se puede utilizar electroporación a efectos de introducir polinucleótidos en un huésped. Si el vector es un virus, el mismo se puede empaquetar *in vitro* o se puede introducir en una célula de empaquetamiento y el virus empaquetado se puede transducir en las células. Son bien conocidas una amplia variedad de técnicas adecuadas para preparar polinucleótidos y para introducir polinucleótidos en células de acuerdo con este aspecto de la presente invención, y las mismas constituyen una rutina para los expertos en la materia. Dichas técnicas se revisan en detalle en Sambrook *et al*, citado anteriormente, que es un ejemplo de los muchos manuales de laboratorio que detallan estas técnicas. De acuerdo con este aspecto de la presente invención, el vector puede ser, por ejemplo, un vector de plásmido, un vector de fago de cadena simple o de cadena doble, un vector viral de ARN o ADN de cadena simple o de cadena doble. Dichos vectores se pueden introducir en las células como polinucleótidos, preferentemente ADN, mediante técnicas bien conocidas para introducir ADN y ARN en las células. En el caso de vectores de fago y virales, dichos vectores también se pueden introducir, y preferentemente se introducen, en las células como virus empaquetados o encapsulados mediante técnicas bien conocidas para la infección y transducción. Los vectores virales pueden ser competentes de replicación o imposibilitados de replicación. en este último caso, la propagación viral tendrá lugar generalmente solo en células huésped complementarias.

En ciertos aspectos, entre los vectores resultan preferentes los vectores para la expresión de polinucleótidos y polipéptidos según la presente invención. Generalmente, dichos vectores comprenden regiones de control de acción cis efectivas para la expresión en un huésped operativamente enlazado al polinucleótido que se debe expresar. Los factores apropiados de acción trans son suministrados por el huésped, por un vector complementario o por el propio vector tras su introducción en el huésped.

En este sentido, en ciertas formas de realización preferidas, los vectores proporcionan una expresión específica. dicha expresión específica puede ser una expresión inducible o una expresión únicamente en determinados tipos de células, o a la vez inducible y específica de células. Entre los vectores inducibles, son particularmente preferentes los vectores en los que se puede inducir la expresión mediante factores ambientales fáciles de manipular, tales como la temperatura y los aditivos nutrientes. Una variedad de vectores adecuados en este aspecto de la presente invención, incluyendo vectores de expresión constitutivos e inducibles para su utilización en huéspedes procariotas y eucariotas, son bien conocidos y utilizados rutinariamente por los expertos en la materia.

Las células huésped diseñadas se pueden cultivar en un medio nutriente convencional, que se puede modificar apropiadamente para, entre otros, activar promotores, seleccionar transformantes o amplificar genes. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, utilizadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, generalmente serán adecuadas para la expresión de polipéptidos según la presente invención, tal como será evidente para los expertos en la materia.

Se puede utilizar una amplia variedad de vectores de expresión a efectos de expresar un polipéptido según la presente invención. Dichos vectores incluyen vectores cromosómicos, episomales y derivados del virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, de bacteriófagos, de episomas de levadura, de elementos cromosómicos

de levadura, de virus tales como baculovirus, virus papova, tal como SV40, virus vaccinia, adenovirus, virus de la gripe aviar, virus del herpes porcino, retrovirus y alfa virus tales como el virus Sindbis, y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como los derivados de plásmidos y elementos genéticos bacteriófagos, tales como cósmicos y fagemidos, todos ellos pueden ser utilizados para la expresión de acuerdo con este aspecto de la presente invención. Generalmente, cualquier vector adecuado para mantener, propagar o expresar polinucleótidos a efectos de expresar un polipéptido en un huésped se puede utilizar para la expresión en este aspecto.

La secuencia de ADN apropiada se puede insertar en el vector mediante una variedad de técnicas rutinarias bien conocidas. En general, una secuencia de ADN para la expresión se une a un vector de expresión escindiendo la secuencia de ADN y el vector de expresión con una o más endonucleasas de restricción y a continuación uniendo los fragmentos de restricción utilizando T4 ADN ligasa. Los procedimientos para la restricción y ligación que se pueden utilizar con este objetivo son bien conocidos y rutinarios para los expertos en la materia. Se describen procedimientos adecuados en este sentido, y para construir vectores de expresión utilizando técnicas alternativas, que también son bien conocidas y rutinarias para los expertos en la materia, se describen con gran detalle en Sambrook *et al*, citado anteriormente.

La secuencia de ADN en el vector de expresión esta operativamente enlazada a una secuencia o secuencias de control adecuadas, incluyendo, por ejemplo, un promotor a efectos de dirigir la transcripción de ARNm. Los representantes de dichos promotores incluyen el promotor de fago lambda PL, los promotores lac en *E. coli*, trp, tac y trc, los promotores SV40 tempranos y tardíos, y los promotores de LTR retrovirales, por nombrar solo algunos de los promotores bien conocidos. Se comprenderá que numerosos promotores no mencionados en la presente memoria son adecuados para su utilización en este aspecto de la presente invención, son bien conocidos y pueden ser fácilmente utilizados por los expertos en la materia, ilustrada por la descripción y los ejemplos de la presente memoria.

En general, los constructos de expresión contendrán lugares para la iniciación y terminación de la transcripción y, en la región transcrita, un lugar de enlazamiento de ribosoma para la traducción. La parte codificadora de las transcripciones expresadas por los constructos incluirá un AUG iniciador de traducción en el inicio y un codón de terminación situado apropiadamente en el extremo de polipéptido que se debe traducir.

Además, los constructos pueden contener regiones de control que regulan y engendran la expresión. Generalmente, de acuerdo con muchos procedimientos de práctica común, dichas regiones funcionarán controlando la transcripción, tales como lugares de enlazamiento de represores y potenciadores, entre otros.

Los vectores para la propagación y expresión incluirán habitualmente marcadores seleccionables. Dichos marcadores también pueden ser adecuados para la amplificación, o los vectores pueden contener marcadores adicionales con este propósito. En este sentido, los vectores de expresión contienen preferentemente uno o más genes marcadores seleccionables a efectos de proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células huésped transformadas. Los marcadores preferidos incluyen genes de resistencia a dihidrofolato reductasa, neomicina, puromicina o higromicina para cultivos de células eucariotas, y genes de resistencia a tetraciclina, teomicina, kanamicina o ampicilina para el cultivo de *E. coli* y otras bacterias.

El vector que contiene la secuencia adecuada de ADN tal como se describe en otros puntos de la presente memoria, así como un promotor adecuado y otras secuencias de control apropiadas, pueden ser introducidos en un huésped adecuado utilizando una variedad de técnicas bien conocidas adecuadas para la expresión en el mismo de un polipéptido deseado. Los ejemplos representativos de huéspedes apropiados incluyen células bacterianas, tales como células de *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como células de levadura; células de insecto, tales como células de *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9; células animales, tales como células CHO, COS y de melanoma de Bowes; y células vegetales, preferentemente células de insecto BTI-TN-5B1-4. Son bien conocidos huéspedes para una amplia variedad de constructos de expresión, y los expertos en la materia no tendrán dificultad a partir de la presente descripción para seleccionar fácilmente un huésped para expresar un polipéptido de acuerdo con este aspecto de la presente invención.

También se pueden utilizar diversos sistemas de cultivo celular de mamíferos para la expresión. Los ejemplos de sistemas de expresión de mamíferos incluyen las líneas COS-7 de fibroblasto de riñón de mono (Gluzman *et al*, Cell 23: 175, 1991). Otras líneas celulares capaces de expresar un vector compatible incluyen, por ejemplo, las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa, riñón humano 293 y BHK. En las células huésped de mamíferos, se pueden utilizar una diversidad de sistemas de expresión basados en virus. En los casos en los que se utiliza un adenovirus como vector de expresión, la secuencia de polinucleótido que codifica el RG1 puede estar enlazada en un complejo de transcripción/traducción de adenovirus que consiste en el promotor tardío y una secuencia guía tripartita. La inserción en una región E1 o E3 no esencial del genoma viral dará lugar a un virus viable capaz de expresar RG1 en células huésped infectadas (Logan y Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3655-59, 1984). Además, se pueden utilizar potenciadores de transcripción, tales como el virus del sarcoma de Rous (RSV), a efectos de aumentar la expresión en células huésped de mamíferos.

Más particularmente, la presente invención también incluye constructos recombinantes, tales como constructos de expresión, que comprenden una o más de las secuencias descritas anteriormente. Los constructos comprenden un vector, tal como un plásmido o un vector viral, en el que se ha insertado una secuencia de este tipo según la presente invención. Dicha secuencia se puede insertar en una orientación hacia adelante o hacia atrás. en este aspecto, en

algunas formas de realización preferidas, el constructo comprende además secuencias reguladoras, incluyendo, por ejemplo, un promotor enlazado operativamente a la secuencia. Los expertos en la materia conocen una gran cantidad de vectores y promotores adecuados, y existen muchos vectores comercializados para su utilización en la presente invención.

Los siguientes vectores, que están comercializados, se indican a título de ejemplo. Entre los vectores preferentes para su utilización en bacterias se encuentran pQE70, pQE60 y pQE-9, disponibles a través de Qiagen USA (Valencia, CA); vectores pBS, vectores Phagescript®, vectores Bluescript®, pNH8A, pNHI6a, pNHI8A, pNH46A, disponibles a través de Stratagene (LaJolla, CA); y ptrc99a, pK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5, disponibles a través de Pharmacia Biotech (Piscataway, N.J.). El vector más preferente es el vector pTrcHisB, disponible a través de Invitrogen. Entre los vectores eucariotas preferentes se encuentran pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, PXTI y pSG, disponibles a través de Stratagene; y PSVK3, pBPV, pMSG y pSVL, disponibles a través de Pharmacia Biotech. el vector más preferido es el vector pCIneo, disponible a través de Promega. Dichos vectores se indican únicamente a título de ejemplo de los muchos vectores disponibles comercialmente bien conocidos están disponibles para los expertos en la materia para su utilización de acuerdo con este aspecto de la presente invención. Se apreciará que cualquier otro plásmido o vector adecuado, por ejemplo para la introducción, mantenimiento, propagación o expresión de un polinucleótido o polipéptido según la presente invención en un huésped puede ser utilizado en este aspecto de la presente invención.

Las regiones promotoras se pueden seleccionar de cualquier gen que se desee que utilice vectores que contienen una unidad reportera de la transcripción desprovista de una región promotora, tal como una unidad de transcripción de cloramfenicol acetil transferasa ("cat"), posterior al sitio o sitios de restricción, para introducir un fragmento promotor candidato, es decir, un fragmento que puede contener un promotor. Tal como es bien conocido, la introducción en el vector de un fragmento que contiene un promotor en el sitio de restricción anterior al gen cat da lugar a la producción de actividad CAT, que se puede detectar mediante ensayos CAT estándar. Los vectores adecuados para este propósito son bien conocidos y fácilmente disponibles. Dos vectores de este tipo son pKK232-B y pCM7. De este modo, los promotores para la expresión de polinucleótidos según la presente invención incluyen no solo promotores bien conocidos y fácilmente disponibles, sino promotores que se pueden obtener fácilmente mediante la siguiente técnica, utilizando un gen reportero.

Entre los promotores bacterianos conocidos adecuados para la expresión de polinucleótidos y polipéptidos de acuerdo con la presente invención se encuentran los promotores lacI y lacZ de *E. coli*, los promotores T3 y T7, el promotor tac T5, los promotores lambda PR, PL, el promotor trp y el promotor híbrido trc, que se deriva de los promotores trp y lac. Entre los promotores eucariotas conocidos adecuados en este aspecto se encuentran el promotor inmediato temprano de CMV, el promotor de timidina quinasa de HSV, los promotores SV40 temprano y tardío, los promotores de LTR retrovirales, tales como los del virus del sarcoma de Rous ("RSV") y promotores de la metalotioneina, tal como el promotor de metalotioneina-I de ratón.

La selección de vectores y promotores apropiados para la expresión en una célula huésped es un procedimiento bien conocido, y las técnicas necesarias para la construcción del vector de expresión, la introducción del mismo en el huésped y la expresión en el mismo forman parte de las competencias rutinarias en la técnica.

En general, los vectores de expresión recombinantes incluyen orígenes de replicación, un promotor derivado de un gen altamente expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural en sentido descendente, y un marcador seleccionable para permitir el aislamiento de células que contienen el vector tras la exposición al mismo.

La presente invención también se refiere a células huésped que contienen los constructos descritos anteriormente. La célula huésped puede ser una célula eucariota superior, tal como una célula de mamífero, o una célula eucariota inferior, tal como una célula de levadura, o la misma puede ser una célula procariota, tal como una célula bacteriana. Los constructos en las células huésped pueden ser utilizados de un modo convencional a efectos de producir el producto génico codificado por la secuencia recombinante.

Los polipéptidos se pueden expresar en células de mamífero, de levadura, de bacteria u otras células bajo el control de promotores apropiados. También se pueden utilizar sistemas de producción libres de células a efectos de obtener proteínas que utilizan ARN derivados de los constructos de ADN según la presente invención. Los vectores de clonación y expresión adecuados para su utilización con huéspedes procariotas y eucariotas se describen en Sambrook *et al*, citado en otro punto de la presente memoria.

La transcripción del ADN que codifica los polipéptidos según la presente invención mediante eucariotas superiores se puede aumentar insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de acción cis de ADN, habitualmente de aproximadamente 10 a 300 bp, que actúan haciendo aumentar la actividad de transcripción de un promotor en un tipo de célula huésped determinado. Los ejemplos de promotores incluyen el promotor SV40, situado en la parte tardía del origen de replicación en bp 100 a 270, el promotor temprano de citomegalovirus, el promotor de polio en la parte tardía del origen de replicación, y promotores de adenovirus.

Los polinucleótidos según la presente invención, que codifican la secuencia estructural heteróloga de un polipéptido según la presente invención, generalmente se insertarán en el vector utilizando técnicas estándares, de tal modo que se enlacen operativamente al promotor para la expresión. El polinucleótido se colocará de tal modo que el lugar de iniciación de la transcripción esté situado apropiadamente en 5' con respecto a un lugar de enlazamiento de ribosoma.



El lugar de enlazamiento de ribosoma estará situado en 5' con respecto al AUG que inicia la traducción del polipéptido que se debe expresar. Generalmente, no existirá ninguna otra estructura de lectura abierta que empiece con un codón de iniciación, habitualmente AUG, y esté situado entre el lugar de enlazamiento de ribosoma y el AUG de iniciación. Además, generalmente existirá un codón de terminación de traducción en el extremo del polipéptido, y existirá una señal de poliadenilación y una señal de terminación de transcripción apropiadamente dispuestas en el extremo 3' de la región transcrita.

Para la secreción de la proteína traducida en el lumen del retículo endoplasmático, en el espacio periplásmico o en el entorno extracelular, se pueden incorporar señales de secreción adecuadas en el polipéptido expresado. Dichas señales pueden ser endógenas al polipéptido o pueden ser señales heterólogas. El polipéptido se puede expresar en una forma modificada, tal como una proteína de fusión, y puede incluir no únicamente señales de secreción, sino también regiones funcionales heterólogas adicionales. De este modo, por ejemplo, una región de aminoácidos adicionales, particularmente aminoácidos cargados, se puede añadir al terminal N del polipéptido durante la purificación o durante el tratamiento y almacenamiento posterior a efectos de mejorar la estabilidad y la persistencia en la célula huésped. Además, se pueden añadir regiones especiales al polipéptido a efectos de facilitar la purificación. Dichas regiones se pueden extraer antes de la preparación final del polipéptido. La adición de restos peptídicos a los polipéptidos a efectos de generar secreción o excreción, a efectos de mejorar la estabilidad y a efectos de facilitar la purificación, entre otros, son técnicas comunes y rutinarias en la técnica. Por ejemplo, cuando se requieren grandes cantidades de RG1 para la inducción de anticuerpos, pueden resultar deseables vectores que dirigen una expresión de nivel elevado de proteínas de fusión fácilmente purificadas. Dichos vectores incluyen, sin limitarse a los mismos, los vectores de clonación y expresión multifuncional de *E. coli*, tales como Bluescript® (Stratagene), en los que la secuencia de codificación de *rg1* puede estar ligada en el vector en el mismo marco de lectura que la secuencia para la Met amino terminal y los posteriores 7 residuos de  $\beta$ -galactosidasa, de tal modo que se produce una proteína híbrida; vectores pIN (Van Heede y Shuster, J. Biol. Chem. 264: 5503-5509, 1989) y similares. Se pueden utilizar vectores PTrcHis (Invitrogen, Carlsbad, CA) a efectos de expresar polipéptidos ajenos como proteínas de fusión que contienen una etiqueta de polihistidina (6xHis) para una purificación rápida. Las proteínas preparadas en dichos sistemas se diseñan de tal modo que incluyen lugares de escisión, tal como un lugar de escisión de enteroquinasa, de tal modo que el polipéptido clonado de interés se pueda liberar del resto peptídico de fusión a voluntad.

Tras la transformación de una cepa de huésped adecuada y el crecimiento de la cepa de huésped hasta una densidad celular apropiada, los promotores inducibles, si los hay, pueden ser inducidos mediante medios apropiados (por ejemplo, cambio de temperatura o exposición a un inductor químico) y las células se pueden cultivar durante un periodo adicional.

A continuación, las células se recogen típicamente por centrifugación, se someten a disrupción por medios físicos o químicos y el extracto crudo resultante se conserva para una purificación adicional.

Las células microbianas utilizadas en la expresión de proteínas se pueden someter a disrupción mediante cualquier método adecuado, incluyendo ciclos de congelación-descongelación, sonicación, disrupción mecánica o utilización de agentes lisantes celulares. Dichos métodos son bien conocidos por los expertos en la materia.

El polipéptido RG1 se puede recuperar y purificar a partir de cultivos celulares recombinantes mediante métodos bien conocidos, incluyendo precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía en hidroxilapatita y cromatografía en lectina. De la forma más preferente, se utiliza cromatografía líquida de alta resolución ("HPLC") para la purificación. Se pueden utilizar técnicas bien conocidas para plegar la proteína a efectos de regenerar la conformación activa cuando el polipéptido se desnaturaliza durante el aislamiento y/o purificación. Diversos otros métodos de purificación proteínica bien conocidos en la técnica incluyen los descritos en Deutscher, M., *Methods In Enzymology*, Vol 182, Academic Press, San Diego, 1982; y Scopes, R., *Protein Purification: Principles and Practice* Springer-Verlag, Nueva York, 1982.

Alternativamente, los polipéptidos según la presente invención pueden ser producidos por síntesis peptídica directa utilizando técnicas de fase sólida (Stewart *et al*, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W. H. Freeman Co., San Francisco, 1969; Merrifield, J., *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149-2154, 1963). La síntesis proteínica *in vitro* se puede llevar a cabo utilizando técnicas manuales o automáticamente. La síntesis automatizada se puede alcanzar, por ejemplo, utilizando el sintetizador Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer, Foster City, California) y de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Se pueden sintetizar químicamente diversos fragmentos que RG1 por separado y combinarse utilizando métodos químicos a efectos de producir la molécula de longitud completa.

Los polipéptidos según la presente invención incluyen productos naturalmente purificados, productos de procedimientos químicos sintéticos, y productos producidos por técnicas recombinantes a partir de un huésped procarionota o eucariota, por ejemplo, células bacterianas, de levadura, de vegetal superior, de insecto y de mamífero. Dependiendo del huésped utilizado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos según la presente invención pueden ser glicosilados o no glicosilados. Además, los polipéptidos según la presente invención también pueden incluir un residuo de metionina inicial modificado, en algunos casos como resultado de procedimientos mediados por el huésped.

*Aplicaciones de polipéptidos RG1 y polinucleótidos que los codifican*

Los polinucleótidos *rg1* y los polipéptidos RG1 se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención para una variedad de aplicaciones, particularmente las que hacen uso de las propiedades químicas y biológicas de RG1. Aplicaciones adicionales se refieren al diagnóstico y tratamiento de enfermedades de proliferación celular, tales como el cáncer de próstata. Estos aspectos de la invención se ilustran con mayor detalle en la siguiente descripción y son descritos adicionalmente en el cuerpo de la presente memoria.

Las razones para la utilización de las secuencias de polinucleótidos y polipéptidos según la presente invención se basan en parte en la homología química y estructural entre el RG1 dado a conocer en la presente memoria y otras moléculas de matriz extracelular, y en la expresión preferida de RG1 en los tejidos prostáticos en comparación con otros tejidos. RG1 puede ser utilizado en el diagnóstico y tratamiento de condiciones, desórdenes o enfermedades asociados a un crecimiento inadecuado del tejido prostático. Estos incluyen, sin limitarse a los mismos, el cáncer y el crecimiento tumoral metastático.

Las secuencias de polinucleótidos *rg1* se pueden utilizar como sondas de ADN y como dianas para terapia antisentido y de ribozimas, o como plantillas para la producción de polinucleótidos antisentido.

Los polipéptidos RG1 se pueden utilizar a efectos de generar anticuerpos frente a RG1 que pueden resultar útiles para la detección de los niveles de polipéptido RG1 presente en células y tejidos, y a efectos de dirigir fármacos a tumores primarios y metastásicos.

Los polipéptidos RG1 se pueden utilizar para estimular una respuesta inmune a las células que contienen RG1.

Los polinucleótidos que codifican RG1 pueden resultar útiles en ensayos de diagnóstico para detectar los niveles de polinucleótidos que codifican RG1 en células y tejidos.

En condiciones asociadas a la expresión de RG1, tal como cáncer de próstata, puede resultar ventajoso suprimir la expresión o la actividad de RG1. La expresión de RG1 se puede eliminar mediante la administración de oligonucleótidos antisentido o ribozimas. Alternativamente, se pueden administrar anticuerpos que reconocen específicamente las zonas del polipéptido RG1 responsables de su actividad a efectos de tratar enfermedades o condiciones asociadas con la actividad de RG1.

*Ensayos de polinucleótidos*

La presente invención también se refiere a la utilización de los polinucleótidos relacionados con *rg1* para detectar polinucleótidos complementarios, tales como, por ejemplo, un reactivo de diagnóstico. La detección de polinucleótidos *rg1* asociados con un estado de enfermedad proporciona una herramienta para el desarrollo de diagnósticos *in vitro* e *in vivo* que pueden añadir o definir un diagnóstico de una enfermedad o susceptibilidad hacia una enfermedad resultante de la expresión específica de tejido de RG1.

Los individuos portadores de mutaciones en el gen que codifica el RG1 se pueden detectar a través del ADN mediante una variedad de técnicas. Se pueden obtener muestras de polinucleótidos para la diagnosis a partir de las células del paciente, por ejemplo a partir de sangre, orina, saliva, biopsia de tejidos y material de autopsia. El ADN genómico se puede utilizar directamente para la detección o se puede amplificar enzimáticamente utilizando PCR antes del análisis (Saiki *et al*, Nature, 324: 163-166, 1986). También se puede utilizar ARN o ADNc en el mismo sentido. A título de ejemplo, se pueden utilizar cebadores PCR complementarios a la secuencia de polinucleótido que codifica RG1 a efectos de identificar y analizar la expresión de las mutaciones de *rg1*. Por ejemplo, se pueden detectar eliminaciones e inserciones por un cambio en el tamaño del producto amplificado en comparación con el genotipo normal. Las mutaciones puntuales se pueden identificar hibridizando ADN amplificado a ARN de *rg1* marcado radioactivamente, o alternativamente secuencias de ADN antisentido de *rg1* marcado radioactivamente. Las secuencias perfectamente coincidentes se pueden distinguir de los dobletes no coincidentes mediante digestión por ARNasa A o a través de diferencias en las temperaturas de fusión.

Las diferencias de secuencia entre un gen de referencia y genes que presentan mutaciones también se pueden detectar por secuenciación directa de ADN. Además, se pueden utilizar segmentos de ADN clonados como sondas para detectar segmentos específicos de ADN. La sensibilidad de dichos métodos se puede mejorar en gran medida utilizando apropiadamente PCR u otro método de amplificación. Por ejemplo, se utiliza un cebador de secuenciación con un producto de PCR de doble cadena o una molécula plantilla de cadena simple generada por un PCR modificado. la determinación de la secuencia se lleva a cabo mediante procedimientos convencionales con polinucleótido marcado radioactivamente o mediante procedimientos automáticos de secuenciación con etiquetas fluorescentes.

Se puede alcanzar un ensayo genético sobre la base de las diferencias de secuencia de ADN mediante la detección de una modificación en la movilidad electroforética de fragmentos de ADN en geles, con o sin agentes desnaturizantes. las pequeñas eliminaciones e inserciones de secuencia se pueden visualizar mediante electroforesis en gel de alta resolución. Los fragmentos de ADN de secuencias diferentes se pueden distinguir en geles de gradiente de formamida desnaturizante en los que las habilidades de diferentes fragmentos de ADN se retrasan en el gel en diferentes posi-

ciones según sus temperaturas de fusión específicas o temperaturas de fusión parciales (véase, por ejemplo, Myers *et al*, Science, 230: 1242, 1985).

Los cambios de secuencia en localizaciones específicas también pueden ser revelados por ensayos de protección de nucleasa, tales como protección a ARNasa y a S1, o por el método de escisión química (por ejemplo, Catton *et al*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85: 4397-4401, 1985).

De este modo, la detección de una secuencia específica de ADN se puede alcanzar mediante métodos tales como hibridización, protección a ARNasa, escisión química, secuenciación directa de ADN utilización de enzimas de restricción (por ejemplo, polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción ("RFLP") y Southern blotting de ADN genómico).

Además de mediante los métodos más convencionales de electroforesis en gel y secuenciación de ADN, las mutaciones también se pueden detectar mediante análisis *in situ*.

#### Ensayos de polipéptidos

La presente invención también se refiere a ensayos de diagnóstico tales como ensayos cuantitativos y diagnósticos para detectar niveles de polipéptido RG1 en células y tejidos y fluidos corporales, incluyendo la determinación de niveles normales y anormales. Así, por ejemplo, se puede utilizar un ensayo de diagnóstico de acuerdo con la presente invención para detectar la sobreexpresión de polipéptido RG1 en comparación con muestras de tejido normal de control a efectos de detectar la presencia de neoplasia, por ejemplo cáncer de próstata. Estos ensayos de diagnóstico se pueden utilizar también para detectar crecimiento tumoral metastásico. Las técnicas de ensayo que se pueden utilizar para determinar los niveles de un polipéptido, tal como un polipéptido RG1 según la presente invención, en una muestra derivada de un huésped, son bien conocidas por los expertos en la materia. Dichos métodos de ensayo incluyen radioinmunoensayos (RIA), ensayos de enlazamiento competitivo, análisis Western blot y ensayos por inmunoadsorción ligados a enzimas (ELISA) y clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). De entre estos, frecuentemente resultan preferentes los ensayos ELISA. Un ensayo ELISA comprende inicialmente la preparación de un anticuerpo específico a RG1, preferentemente un anticuerpo monoclonal. Además, generalmente se prepara un anticuerpo reportero que se enlaza al anticuerpo monoclonal. El anticuerpo reportero se fija a un reactivo detectable, tal como un reactivo radiactivo, fluorescente o enzimático, en el presente ejemplo una enzima peroxidasa de rábano.

Para llevar a cabo un ensayo ELISA, se extrae una muestra de un huésped y se incuba en un soporte sólido, por ejemplo un plato de poliestireno que se enlaza con los polipéptidos de la muestra. A continuación, todos los lugares de enlazamiento de polipéptido libres del plato se cubren incubando con una proteína no específica, tal como albúmina de suero bovino. A continuación, el anticuerpo monoclonal se incuba en el plato, tiempo durante el cual los anticuerpos monoclonales se fijan a todos los polipéptidos RG1 fijados sobre el plato de poliestireno. Los anticuerpos monoclonales no enlazados se eliminan por lavado con amortiguador. El anticuerpo reportero enlazado a la peroxidasa de rábano se coloca en el plato, provocando el enlazamiento del anticuerpo reportero a todos los anticuerpos monoclonales enlazados a RG1. A continuación se elimina el anticuerpo reportero no fijado por lavado. A continuación se añaden al plato reactivos para la actividad de la peroxidasa, incluyendo un sustrato colorimétrico. La peroxidasa inmovilizada, enlazada a RG1 a través de los anticuerpos primarios y secundarios, da lugar a un producto de reacción coloreado. La cantidad de color desarrollada en un determinado período de tiempo indica la cantidad de polipéptido RG1 presente en la muestra. Típicamente se obtienen resultados cuantitativos haciendo referencia a una curva estándar.

Se puede utilizar un ensayo competitivo en el que anticuerpos específicos a RG1 se fijan sobre un soporte sólido y se marcan como RG1, y una muestra derivada del huésped se hace pasar por encima del soporte sólido y la cantidad de etiqueta detectada fijada al soporte sólido se puede correlacionar con la cantidad de RG1 presente en la muestra.

Estos y otros ensayos se describen, entre otros, en Hampton *et al* (Serological Methods, a Laboratory Manual, APS Press, St Paul, Minn, 1990) y en Maddox *et al* (J. Exp. Med. 158: 12111, 1983).

#### Anticuerpos

La presente invención se refiere además a anticuerpos que se enlazan específicamente a RG1, designados en la presente memoria anticuerpos RG1. La sobreexpresión de RG1 en tejidos prostáticos y su localización en la superficie celular representan características de un excelente marcador para llevar a cabo ensayos de barrido, diagnosis, prognosis, seguimiento y métodos por imagen. Además, dichas características indican que el RG1 puede ser una diana excelente para métodos terapéuticos, tales como terapia dirigida por anticuerpos, inmunoterapia y terapia génica. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "se enlaza específicamente a" se refiere a la interacción de un anticuerpo y un polipéptido, en la que la interacción depende de la presencia de una estructura particular (es decir, el determinante antigénico o epítipo) sobre polipéptido; en otras palabras, el anticuerpo reconoce y se enlaza a una estructura polipeptídica específica en lugar de a proteínas en general.

Los polipéptidos RG1, sus fragmentos u otros derivados, o análogos de los mismos, o células que los expresan, se pueden utilizar como un inmunogen a efectos de producir anticuerpos frente a los mismos (Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press, NY (1989)). Dichos anticuerpos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos policlonales o monoclonales. La presente invención también incluye anticuerpos quiméricos, de cadena simple, humanizados y humanos, así

como fragmentos Fab o el producto de una biblioteca de expresión de Fab. Se pueden utilizar diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de dichos anticuerpos y fragmentos.

Los anticuerpos generados contra los polipéptidos correspondientes a una secuencia según la presente invención se pueden obtener por inyección directa de los polipéptidos en un animal o administrando dichos polipéptidos en un animal, preferentemente no humano. El anticuerpo obtenido de este modo se enlazarán a continuación a los propios polipéptidos. De este modo, incluso una secuencia que codifica únicamente un fragmento de los polipéptidos se puede utilizar a efectos de generar anticuerpos que se enlacen a los polipéptidos nativos enteros. A continuación, dichos anticuerpos se pueden utilizar para aislar el polipéptido del tejido que expresa dicho polipéptido.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales, se puede utilizar cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos mediante cultivos continuos de líneas celulares. Ejemplos de las mismas incluyen la técnica del hibridoma (Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495-497, 1975), la técnica del hibridoma de célula B humana (Kozbor *et al*, *Immunology Today* 4: 72, 1983) y la técnica del hibridoma EBV, a efectos de producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al*, en *Monoclonal Antibodies and Cancer*, Alan R. Liss, Inc., 77-96, 1985).

Además, se pueden utilizar técnicas desarrolladas para la producción de “anticuerpos quiméricos”, splicing de genes de anticuerpos de ratón a genes de anticuerpos humanos a efectos de obtener una molécula con una especificidad antigénica y una actividad biológica apropiadas (Morrison *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855, 1984; Neuberger *et al*, *Nature* 312: 604-608, 1984; Takeda *et al*, *Nature* 314: 452-454, 1985). Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (patente US nº 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena sencilla específicos a RG1.

Además, se pueden producir anticuerpos “humanos” utilizando los métodos descritos en las patentes US nº 5.877.397 y nº 5.569.825, que se incorporan como referencia en la presente memoria.

Los anticuerpos también se pueden producir induciendo la producción *in vivo* en la población de linfocitos o realizando un barrido de bibliotecas de inmunoglobulina recombinante o paneles de reactivos enlazantes altamente específicos, tal como se da a conocer en Orlandi *et al* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3833-3837, 1989) y Winter and Milstein (*Nature* 349:293-299, 1991).

También se pueden generar fragmentos de anticuerpo que contienen lugares específicos de enlazamiento para RG1. Por ejemplo, dichos fragmentos incluyen, sin limitarse a los mismos, los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, que pueden ser producidos por digestión de pepsina de la molécula de anticuerpo, y los fragmentos Fab que se pueden generar reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Alternativamente, se pueden construir bibliotecas de expresión de Fab para permitir una identificación rápida y sencilla de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada (Huse *et al*, *Science* 256:1270-1281, 1989).

La secuencia de aminoácidos de RG1 presentada en la presente memoria se puede utilizar para seleccionar regiones específicas del polipéptido RG1 a efectos de generar anticuerpos. Tal como comprenderán los expertos en la materia, las regiones o epítopes de un polipéptido RG1 al que se dirige un anticuerpo pueden variar según la aplicación. Por ejemplo, los anticuerpos dirigidos a su utilización en un inmunoensayo para la detección de RG1 enlazado a membrana sobre células prostáticas se deben dirigir hacia los epítopes accesibles del polipéptido RG1. Las regiones del polipéptido RG1 que muestran estructura inmunogénica, así como otras regiones y dominios, se pueden identificar fácilmente utilizando diversos otros métodos conocidos en la técnica, tales como análisis de Chou-Fasman, Gamier-Robson o Jameson-Wolf. Los fragmentos que contienen estos residuos son particularmente adecuados para generar anticuerpos anti-RG1. Los fragmentos particularmente útiles incluyen, sin limitarse a los mismos, las secuencias PLGGESICSA GPAKYSIT (SEC ID nº: 8); HSSDYSMWRKNQYVS (SEC ID nº: 10); DAGTDSGFTFSSPNFATIPQDTV (SEC ID nº: 11); y NEIVDSASVPET (SEC ID nº: 12). La generación de anticuerpos policlonales frente a dichas regiones se describe en el ejemplo 4.

Los anticuerpos RG1 según la presente invención pueden ser particularmente útiles en ensayos de diagnóstico, metodologías por imagen y métodos terapéuticos para el tratamiento del cáncer de próstata. La presente invención da a conocer diversos ensayos inmunológicos útiles para la detección de polipéptidos RG1 y para la diagnosis del cáncer de próstata. Generalmente, dichos ensayos comprenden uno o más anticuerpos RG1 capaces de reconocer y enlazar un polipéptido RG1. Los anticuerpos más preferentes se enlazarán selectivamente a RG1, y no se enlazarán (o lo harán débilmente) a polipéptidos no RG1. Los ensayos incluyen diversos formatos de ensayo inmunológico bien conocidos en la técnica, incluyendo, sin limitarse a los mismos, diversos tipos de radioinmunoensayos, ensayos por inmunoabsorción ligados a enzimas y similares. Además, la presente invención también da a conocer métodos inmunológicos por imagen capaces de detectar el cáncer de próstata, incluyendo, sin limitarse a los mismos, métodos de imagen radioescintigráficos que utilizan anticuerpos RG1 marcados. Dichos ensayos pueden ser clínicamente útiles en la detección, control y pronosis del cáncer de próstata.

Los anticuerpos descritos anteriormente se pueden utilizar para aislar o para identificar clones que expresan el polipéptido, o para purificar el polipéptido según la presente invención mediante fijación del anticuerpo a un soporte sólido para el aislamiento y/o purificación por cromatografía por afinidad.

Adicionalmente, se pueden utilizar anticuerpos RG1 para aislar células positivas a RG1 utilizando técnicas de clasificación celular y purificación. Particularmente, los anticuerpos RG1 se pueden utilizar para aislar células de cáncer de próstata procedentes de tejido tumoral de xenotransplante, procedentes de células en cultivo, etc., utilizando clasificación celular basada en anticuerpos o técnicas de purificación por afinidad. otras aplicaciones de los anticuerpos RG1 según la presente invención incluyen generar anticuerpos antiidiotípicos que imitan el polipéptido RG1.

Los anticuerpos RG1 pueden ser utilizados para detectar la presencia de cáncer de próstata o metástasis tumoral. la presencia de células que contienen RG1 en diversas muestras biológicas, incluyendo suero, próstata y otros especímenes de biopsia de tejido, puede ser detectada con anticuerpos RG1. Además, los anticuerpos RG1 pueden ser utilizados en diversas metodologías de imagen, tal como inmunoescintigrafía con anticuerpo marcado con <sup>99m</sup>Tc (u otro isótopo). Por ejemplo, un protocolo de análisis por imagen similar al recientemente descrito utilizando un anticuerpo anti-PSMA marcado con <sup>111</sup>In se puede utilizar para detectar carcinomas de próstata recurrentes y metastáticos (Sodee *et al*, Clin. Nuc. Med. 21: 759-766, 1997).

Los anticuerpos RG1 según la presente invención se pueden marcar con un marcador detectable o conjugar con una segunda molécula, tal como un agente citotóxico, y ser utilizados para dirigir dicha segunda molécula a una célula positiva a RG1 (Vitetta, E.S. *et al*, Immunotoxin Therapy, en DeVita, Jr, V.T. *et al*, eds, Cancer: Principles and Practice of Oncology, 4ª ed., J. B. Lippincott Co., Filadelfia, 2624-2636, 1993). Los ejemplos de agentes citotóxicos incluyen, sin limitarse a los mismos, ricina, doxorubicina, daunorrubicina, taxol, bromuro de etidio, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, dihidroxiantracendiona, actinomicina D, toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas* (PE) A, PE40, abrina, glucocorticoide y otros agentes quimioterapéuticos, así como radioisótopos. Los marcadores detectables adecuados incluyen, sin limitarse a los mismos, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un quelante metálico o una enzima. Los radioisótopos adecuados incluyen los siguientes: antimonio-124, antimonio-125, arsénico-74, bario-103, bario-140, berilio-7, bismuto-j206, bismuto-207, cadmio-109, cadmio-115m, calcio-45, cerio-139, cerio-141, cerio-144, cesio-137, cromo-51, cobalto-56, cobalto-57, cobalto-58, cobalto-60, cobalto-64, erbio-169, europio-152, gadolinio-153, oro-195, oro-199, hafnio-175, hafnio-181, indio-111, yodo-123, yodo-131, iridio-192, hierro-55, hierro-59, criptón-85, plomo-210, manganeso-54, mercurio-197, mercurio-203, molibdeno-99, neodimio-147, neptunio-237, níquel-63, niobio-95, osmio-185+191, paladio-103, platino-195m, praseodimio-143, prometio-147, protactinio-233, radio-226, renio-186, rubidio-86, rutenio-103, rutenio-106, escandio-44, escandio-46, selenio-75, plata-110m, sodio-22, estroncio-85, estroncio-89, estroncio-90, azufre-35, tántalo-182, tecnecio-99m, telurio-125, telurio-132, talio-170, talio-204, torio-228, torio-232, estaño-113, titanio-44, tungsteno-185, vanadio-48, vanadio-49, iterbio-169, itrio-88, itrio-90, itrio-91, zinc-65 y zirconio-95.

### 35 *Inmunoterapia para cáncer de próstata*

La presente invención da a conocer diversos métodos inmunoterapéuticos para tratar el cáncer de próstata, incluyendo los enfoques de terapia con anticuerpos, vacunas *in vivo* e inmunoterapia *ex vivo*. En un enfoque, la presente invención da a conocer anticuerpos RG1 que se pueden utilizar sistémicamente a efectos de tratar el cáncer de próstata. Por ejemplo, se pueden introducir anticuerpos RG1 no conjugados en un paciente de tal modo que dicho anticuerpo se enlace al RG1 presente sobre las células de cáncer de próstata, en las mismas o asociado a las mismas, y media en la destrucción de dichas células y el tumor mediante mecanismos que pueden incluir citólisis mediada por complemento, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, alterándose la función fisiológica de RG1 y/o la inhibición de las rutas de enlazamiento de ligando o transducción de señal. Los anticuerpos RG1 conjugados a agentes tóxicos tales como resina o radioisótopos también se pueden utilizar terapéuticamente a efectos de suministrar el agente tóxico directamente a las células de tumor prostático que presentan RG1, y de este modo destruir las células tumorales.

La inmunoterapia del cáncer de próstata utilizando anticuerpos RG1 puede seguir las directrices generadas por diversos enfoques que se han utilizado con éxito en otros tipos de cáncer, incluyendo, sin limitarse a los mismos, cáncer de colon (Arlen *et al*, Crit. Rev. Immunol. 18: 133-138, 1998), mieloma múltiple (Ozaki *et al*, Blood 90: 3179-3186, 1997; Tsunenari *et al*, Blood 90: 2437-2444, 1997), cáncer gástrico (Kasprzyk *et al*, Cancer Res. 52: 2771-2776, 1992), linfoma de células B (Funakoshi *et al*, Immunther. Emphasis Tumor Immunol. 19: 93-101, 1996), leucemia (Zhong *et al*, Leuk. Res. 20: 581-589, 1996), cáncer colorrectal (Moun *et al*, Cancer Res. 54: 6160-6166, 1994; Velders *et al*, Cancer Res. 55: 4398-4403, 1995), y cáncer de pecho (Shepard *et al*, J. Clin. Immunol. 11: 117-127, 1991).

Además, la presente invención da a conocer vacunas formuladas para contener un polipéptido de RG1 o un fragmento del mismo. La utilización de un antígeno tumoral en una vacuna para generar inmunidad humoral y mediada por células para su utilización en terapias contra el cáncer es bien conocida en la técnica y ha sido utilizada en cáncer de próstata utilizando inmunógenes de PSMA humanos y de PAP de roedor (Hodge *et al*, Int. J. Cancer 63: 231-237, 1995; Fong *et al*, J. Immunol. 159: 3113-3117, 1997). Dichos métodos se pueden llevar a cabo fácilmente utilizando un polipéptido RG1 o un fragmento del mismo, o una molécula de ácido nucleico que codifica RG1 y vectores recombinantes capaces de expresar y presentar apropiadamente el inmunógeno RG1.

Por ejemplo, se pueden utilizar sistemas de administración de genes virales a efectos de suministrar una molécula de ácido nucleico que codifica RG1. Diversos sistemas de administración de genes virales que se pueden utilizar en la práctica de este aspecto de la presente invención incluyen, sin limitarse a los mismos, virus vaccinia, virus de la gripe aviar, virus canary pox, adenovirus, virus de la gripe, poliovirus, virus adenoasociados, lentivirus y virus Sindbus

(Restifo, en Curr. Opin. Immunol. 8: 658-663, 1996). También se pueden utilizar sistemas de administración no virales utilizando ADN desnudo que codifica un polipéptido RG1 o un fragmento del mismo que se introduce en el paciente (es decir, intramuscularmente) a efectos de inducir una respuesta antitumoral. En una forma de realización, se puede utilizar el ADNc de *rg1* humano de longitud completa. En otra forma de realización, se pueden utilizar fragmentos de ADNc de *rg1* humano. En otra forma de realización, se pueden utilizar moléculas de ácido nucleico de *rg1* que codifican epítopes de linfocitos T específicos (CTL). Los epítopes de CTL se pueden determinar utilizando algoritmos específicos (por ejemplo, Epimer, Brown University) a efectos de identificar péptidos dentro de un polipéptido RG1 que son capaces de enlazarse óptimamente a alelos HLA especificados.

También se pueden utilizar diversas estrategias *ex vivo*. Un enfoque comprende la utilización de células dendríticas a efectos de presentar un polipéptido RG1 como antígeno al sistema inmune de un paciente. Las células dendríticas expresan MHC de clase I y II, un coestimulador B7, e IL-12, y de este modo constituyen células presentadoras de antígenos altamente especializadas. En el cáncer de próstata, se están utilizando células dendríticas autólogas cargadas con péptidos del antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) en un ensayo clínico en fase I a efectos de estimular los sistemas inmunes de los pacientes de cáncer de próstata (Tjoa *et al*, Prostate 28: 65-69, 1996; Murphy *et al*, Prostate 29: 371-380, 1996). Las células dendríticas se pueden utilizar para presentar polipéptidos RG1 a células T en el contexto de moléculas de MHC de clase I y II. En una forma de realización, las células dendríticas autólogas se cargan con polipéptidos RG1 capaces de enlazarse a moléculas de MHC. En otra forma de realización, las células dendríticas se cargan con el polipéptido RG1 completo. Otra forma de realización comprende diseñar la sobreexpresión del gen *rg1* en células dendríticas utilizando diversos vectores de implementación conocidos en la técnica, tales como adenovirus (Arthur *et al*, Cancer Gene Ther. 4: 17-25, 1997), retrovirus (Henderson *et al*, Cancer Res. 56: 3763-3770, 1996), lentivirus, virus adenoasociados, transfección de ADN (Ribas *et al*, Cancer Res. 57: 2865-2869, 1997) y transfección de ARN derivado de tumor (Ashley *et al*, J. Exp. Med. 186: 1177-1182, 1997).

También se pueden utilizar anticuerpos anti-RG1 antiidiotípicos en terapia contra el cáncer como vacuna para inducir una respuesta inmune a las células que expresan el polipéptido RG1. Específicamente, la generación de anticuerpos antiidiotípicos es conocida en la técnica y se puede adaptar fácilmente a efectos de generar anticuerpos anti-RG1 antiidiotípicos que imitan un epítipo sobre un polipéptido RG1 (véase, por ejemplo, Wagner *et al*, Hybridoma 16: 33-40, 1997; Foon *et al*, J. Clin. Invest. 96: 334-342, 1995; Herlyn *et al*, Cancer Immunol Immunother 43: 65-76, 1996). Un anticuerpo antiidiotípico de este tipo se puede utilizar en terapia antiidiotípica, tal como se practica actualmente, junto con otros anticuerpos antiidiotípicos dirigidos contra antígenos tumorales.

Se pueden utilizar métodos de inmunización genética a efectos de generar respuestas inmunes profilácticas o terapéuticas, humorales y celulares, dirigidas contra células cancerosas que expresan RG1. Utilizando las moléculas de ADN que codifican RG1 descritas en la presente memoria, se pueden inyectar constructos que comprenden ADN que codifican un polipéptido/inmunogen RG1 y secuencias reguladoras apropiadas directamente en el músculo o la piel de un individuo, de tal modo que las células del músculo o de la piel absorban el constructo y expresen el polipéptido/inmunogen RG1 codificado. El polipéptido/inmunogen RG1 se puede expresar como un polipéptido de superficie celular o se puede segregar. La expresión del polipéptido/inmunogen RG1 da lugar a la generación de inmunidad humoral y celular, profiláctica o terapéutica, contra el cáncer de próstata. Se pueden utilizar diversas técnicas de inmunización genética profiláctica y terapéutica conocidas en la técnica (para una visión general, véase la información y referencias publicadas en la dirección de Internet [www.genweb.com](http://www.genweb.com)).

#### Oligonucleótidos antisentido, vectores antisentido y ribozimas

Se pueden preparar polinucleótidos antisentido complementarios a *rg1* sintéticamente. Dichos oligonucleótidos se pueden administrar a células con o sin lípidos que puedan favorecer la absorción de dichos oligonucleótidos antisentido en las células.

Alternativamente, también se pueden utilizar vectores de expresión derivados de retrovirus, adenovirus, herpes o virus vaccinia, o de diversos plásmidos bacterianos, para la construcción y suministro de vectores recombinantes que expresarán *rg1* antisentido. Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook *et al* (*supra*) y Ausubel *et al* (*supra*).

Los polinucleótidos que comprenden la secuencia de ADNc de longitud completa y/o sus elementos reguladores permiten a los investigadores utilizar polinucleótidos *rg1* como herramienta investigativa en cepas sentido (Yousoufian y Lodish, Mol. Cell. Biol. 13: 98-104, 1993) o cepas antisentido (Eguchi, *et al*, Annu. Rev. Biochem. 60: 631-652, 1999) para la regulación de la función génica. Actualmente, dicha tecnología es bien conocida en la técnica y se pueden diseñar oligómeros sentido o antisentido, o fragmentos mayores, a partir de diversas localizaciones a lo largo de las regiones codificadoras o de control.

Los genes que codifican RG1 se pueden desconectar transfectando una célula o tejido con vectores de expresión que expresan niveles elevados de un fragmento de polinucleótido *rg1* deseado. Dichos constructos pueden inundar las células con secuencias sentido o antisentido no traducibles. Incluso en ausencia de integración en el ADN, estos sectores pueden continuar transcribiendo moléculas de ARN hasta que todas las copias han sido deshabilitadas por nucleasas endógenas. La expresión temporal puede durar un mes o más con un vector no replicante, e incluso durante más tiempo si los elementos de replicación apropiados forman parte del sistema vector.

Tal como se ha mencionado anteriormente, la modificación de la expresión génica se puede obtener diseñando moléculas antisentido de ADN o ARN a efectos de controlar regiones de *rg1*, es decir, los promotores, potenciadores e intrones. Resultan preferentes los oligonucleótidos derivados del lugar de iniciación de transcripción, por ejemplo en las regiones situadas entre -10 y +10 de la secuencia guía. Las moléculas antisentido también se pueden diseñar con el objetivo de bloquear la traducción de ARNm, impidiendo que el transcrito se enlace a los ribosomas. Similarmente, se puede alcanzar la inhibición utilizando una metodología de apareamiento de bases de "triple hélice". El apareamiento de triple hélice compromete la capacidad de la doble hélice de abrirse suficientemente para el enlazamiento de polimerasas, factores de transcripción o moléculas reguladoras. Los recientes avances terapéuticos con el uso de ADN de triple hélice han sido revisados por Gee, J.E. *et al.* (en Huber y Car, Molecular and Immunologic Approaches, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, N. Y., 1994).

Las ribozimas son moléculas de ARN enzimático capaces de catalizar la escisión específica de ARN (patente US nº 4.987.071; WO 93/23057). El mecanismo de acción de las ribozimas comprende hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima a ARN diana complementario, seguida de escisión endonucleolítica. se encuentran dentro del alcance de la presente invención las moléculas de ribozima de cabeza de martillo diseñadas que pueden catalizar específica y eficazmente la escisión endonucleolítica del ARN que codifica RG1. Los lugares específicos de escisión de la ribozima dentro de cualquier ARN diana potencial se identifican inicialmente llevando a cabo un barrido de la molécula diana en busca de lugares de escisión de la ribozima que incluyen las siguientes secuencias: GUA, GUU y GUC. Una vez identificadas, en las secuencias cortas de ARN con entre 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región del gen diana que contiene el lugar de escisión se pueden evaluar las características estructurales secundarias que pueden volver inoperable el oligonucleótido. la idoneidad de las dianas candidato también se puede evaluar analizando la accesibilidad a hibridación con oligonucleótidos complementarios utilizando ensayos de protección de ribonucleasa (Irie *et al.*, Advance. Farmacol. 40: 207-257, 1997).

Las moléculas antisentido y las ribozimas según la presente invención se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de moléculas de ARN. Dichos métodos incluyen técnicas para sintetizar químicamente oligonucleótidos, tales como síntesis química de fosforamidito en fase sólida. Alternativamente, las moléculas de ARN se pueden generar mediante transcripción *in vitro* e *in vivo*, o mediante secuencias de ADN que codifican RG1. Dichas secuencias de ADN se pueden incorporar en una amplia variedad de vectores con promotores de ARN polimerasa adecuados, tales como T7 o SP6. Alternativamente, los constructos de ADNc antisentido que sintetizan ARN antisentido pueden ser introducidos constitutiva o indeciblemente en líneas celulares, células o tejidos.

Las moléculas de ARN se pueden modificar a efectos de incrementar la estabilidad intracelular y la vida media. las posibles modificaciones incluyen, sin limitarse a las mismas, la adición de secuencias flanqueantes en los extremos 5' y/o 3' de las moléculas, o la utilización de fosforotioato o 2' O-metilo en lugar de enlaces fosfodiesterasa en el esqueleto de la molécula. También se puede alcanzar una estabilidad mejorada mediante la inclusión de bases no tradicionales, tales como inosina y queosina, así como formas acetil, metil, tio, y formas modificadas similares de adenina, citidina, guanina, timina y uridina, que no son reconocidas tan fácilmente por endonucleasas endógenas.

Los métodos para introducir vectores antisentido en células o tejidos incluyen los descritos a continuación y que resultan igualmente adecuados para terapia *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*. Para la terapia *ex vivo*, los vectores antisentido se introducen en células extraídas del paciente y se propagan clónicamente para el trasplante autólogo en el mismo paciente, tal como se da a conocer en la patente US nº 5.399.493 y nº 5.437.994, dadas a conocer en la presente memoria como referencia. La administración por transfección y por liposomas u otros agentes basados en lípidos o lipídicos es bien conocida en la técnica.

#### *Ensayos para la identificación de agentes que se enlazan a RG1*

La presente invención también se refiere a ensayos y métodos que pueden ser utilizados para identificar agentes que se enlazan a RG1. Específicamente, los agentes que se enlazan a RG1 pueden ser identificados mediante la capacidad del ligando RG1 o de otro agente o constituyente para enlazarse a RG1 y/o la capacidad de inhibir/estimular la actividad de RG1.

Alternativamente, los agentes que se enlazan a un polipéptido RG1 pueden ser identificados utilizando un sistema doble híbrido de levadura o un ensayo de captura por enlace. En el sistema doble híbrido de levadura, una unidad de expresión que codifica una proteína de fusión constituida por una subunidad de un factor de transcripción de dos subunidades y el polipéptido RG1 se introduce y se expresa en una célula de levadura. Las células se modifican adicionalmente a efectos de contener (1) una unidad de expresión que codifica un marcador detectable cuya expresión requiere el factor de transcripción de dos subunidades para la expresión, y (2) una unidad de expresión que codifica una proteína de fusión constituida por la segunda subunidad del factor de transcripción y un segmento clonado de ADN. Si el segmento clonado de ADN codifica una proteína que se enlaza al polipéptido RG1, la expresión resulta en la interacción de RG1 y la proteína codificada. Esto sitúa a las dos subunidades del factor de transcripción en una proximidad de enlace, permitiendo la reconstitución del factor de transcripción. este hecho resulta en la expresión del marcador detectable. El sistema doble híbrido de levadura es particularmente útil en la realización de un barrido de una biblioteca de segmentos de codificación de ADNc para parejas de enlace celular de RG1.

Los polipéptidos RG1 que se pueden utilizar en los ensayos anteriores incluyen, sin limitarse a los mismos, un polipéptido RG1 aislado, un fragmento de un polipéptido RG1, una célula modificada a efectos de expresar un polipéptido

RG1, o una fracción de una célula modificada a efectos de expresar un polipéptido RG1. Además, el polipéptido RG1 puede ser el polipéptido entero o un fragmento definido del polipéptido RG1. Resultará evidente para el experto en la materia que, mientras el polipéptido RG1 se pueda someter a ensayo para el enlazamiento de agentes, por ejemplo mediante un desplazamiento en el peso molecular o en la actividad, se puede utilizar el presente ensayo.

El método utilizado para identificar si un agente/componente celular se enlaza a un polipéptido RG1 se basará principalmente en la naturaleza del polipéptido RG1 utilizado. Por ejemplo, se puede utilizar un ensayo de retardo en gel a efectos de determinar si un agente se enlaza a RG1 o a un fragmento del mismo. Alternativamente, se pueden utilizar tecnologías de inmunodetección y biochip para ser utilizadas con el polipéptido RG1. El experto en la materia puede utilizar fácilmente numerosas técnicas conocidas en la técnica para determinar si un agente en particular se enlaza a un polipéptido RG1.

En los agentes y componentes celulares se puede analizar además la capacidad de modular la actividad de un polipéptido RG1 utilizando un sistema de ensayo desprovisto de células o un sistema de ensayo celular. A medida que las actividades del polipéptido RG1 son más definidas, se pueden utilizar ensayos funcionales basados en la actividad identificada.

Tal como se utiliza en la presente memoria, se dice que un agente antagoniza la actividad de RG1 cuando dicho agente reduce la actividad de RG1. El antagonista preferente antagonizará selectivamente RG1, sin afectar a ninguna otra proteína celular. Además, el antagonista preferente reducirá la actividad de RG1 en más del 50%, más preferentemente en más del 90%, y de la forma más preferente eliminando toda actividad de RG1.

Los agentes que se analizan en el método anterior se pueden seleccionar aleatoriamente, se pueden seleccionar racionalmente o se pueden diseñar. Tal como se utiliza en la presente memoria, se considera que un agente está seleccionado aleatoriamente cuando dicho agente se escoge aleatoriamente sin considerar las secuencias específicas del polipéptido RG1. Un ejemplo de agente seleccionado aleatoriamente es la utilización de una biblioteca química o una biblioteca de combinación de péptidos, o un caldo de crecimiento de un organismo o extracto vegetal.

Tal como se utiliza en la presente memoria, se considera que un agente se selecciona racionalmente o se diseña cuando dicho agente se escoge con un criterio no aleatorio que tiene en cuenta la secuencia del sitio diana y/o su conformación en conexión con la acción de dicho agente. Los agentes se pueden seleccionar racionalmente o diseñar racionalmente utilizando las secuencias peptídicas que constituyen el polipéptido RG1. Por ejemplo, un agente peptídico seleccionado racionalmente puede ser un péptido cuya secuencia de aminoácidos es idéntica a un fragmento de un polipéptido RG1.

Los agentes analizados en los métodos según la presente invención pueden ser, por ejemplo, péptidos, anticuerpos, oligonucleótidos, moléculas pequeñas y derivados vitamínicos, así como hidratos de carbono. Un artesano experto puede reconocer fácilmente que no existe ningún límite en cuanto a la naturaleza estructural de los agentes utilizados en el presente método de barrido. Una clase de agentes según la presente invención son agentes peptídicos cuyas secuencias de aminoácidos se seleccionan basándose en la secuencia de aminoácidos del polipéptido RG1.

Los agentes peptídicos se pueden preparar utilizando métodos de síntesis peptídica en fase sólida (o en solución) estándar, tal como se conocen en la técnica. Además, el ADN que codifica dichos péptidos se puede sintetizar utilizando instrumentación de síntesis comercializada y se puede producir recombinantemente utilizando sistemas de producción recombinante estándares. La producción mediante síntesis peptídica en fase sólida resulta necesaria si se incluyen aminoácidos no codificados por genes.

Otra clase de agentes según la presente invención son los anticuerpos inmunorreactivos con posiciones críticas del polipéptido RG1. Tal como se ha descrito anteriormente, los anticuerpos se obtienen por inmunización de sujetos mamíferos adecuados con péptidos, que contienen como regiones antigénicas aquellas partes del polipéptido RG1 a las que se pretende dirigir los anticuerpos. Dichos agentes se pueden utilizar en estudios de enlace competitivo a efectos de identificar agentes inhibidores de segunda generación, así como a efectos de bloquear la actividad de RG1.

Los extractos celulares ensayados en los métodos según la presente invención pueden ser, por ejemplo, extractos acuosos de células o tejidos, extractos orgánicos de células o tejidos, o fracciones celulares parcialmente purificadas. Un experto en la materia puede reconocer fácilmente que no existe ningún límite en cuanto a la fuente del extracto celular utilizado en el método de barrido según la presente invención.

Los agentes que se enlazan a un polipéptido RG1, tales como un anticuerpo RG1, se pueden utilizar para modular la actividad de RG1, para dirigir agentes anticancerígenos a células de mamífero apropiadas, o para identificar agentes que bloquean la interacción con RG1. Las células que expresan RG1 pueden ser utilizados como diana o identificadas utilizando un agente que se enlaza a RG1.

El modo como se utilicen los agentes enlazantes de RG1 dependerá de la naturaleza del agente enlazante de RG1. Por ejemplo, un agente enlazante de RG1 se puede utilizar para: suministrar toxinas conjugadas, tales como toxina de difteria, toxina de cólera, exotoxina de ricina o pseudomonas; modular la actividad de RG1; destruir directamente una célula que expresa RG1; o, en barridos, para identificar agentes enlazantes competitivos. por ejemplo, un agente



inhibidor de RG1 se puede utilizar para inhibir directamente el crecimiento de las células que expresan RG1, mientras que un agente enlazante de RG1 se puede utilizar como agente de diagnóstico.

#### *Composiciones farmacéuticas y administración*

5 La presente invención se refiere también a composiciones farmacéuticas que pueden comprender polinucleótidos *rg1*, polipéptidos RG1, anticuerpos, agonistas, antagonistas o inhibidores, solos o en combinación por lo menos con otro agente, tal como un compuesto estabilizante, que puede ser administrado mediante cualquier portador farmacéutico biocompatible estéril, incluyendo, sin limitarse a los mismos, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa  
10 y agua. Cualquiera de estas moléculas puede ser administrada a un paciente sola o en combinación con otros agentes, fármacos u hormonas, en composiciones farmacéuticas en las que se mezclan con un excipiente o excipientes, o portadores farmacéuticamente aceptables. En una forma de realización de la presente invención, el portador farmacéuticamente aceptable es farmacéuticamente inerte.

15 La presente invención también se refiere a la administración de composiciones farmacéuticas. Dicha administración se lleva a cabo oral o parenteralmente. Los métodos de administración parenteral incluyen administración tópica, intraarterial (directamente al tumor), intramuscular, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, intravenosa, intraperitoneal o intranasal. Además de los ingredientes activos, estas composiciones farmacéuticas pueden contener portadores adecuados farmacéuticamente aceptables que comprenden excipientes y sustancias auxiliares que facilitan  
20 el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden ser utilizadas farmacéuticamente. Se pueden encontrar otros detalles sobre las técnicas para la formulación y administración en la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences (Ed. Maack Publishing Co, Easton, Pa.).

25 Las composiciones farmacéuticas para la administración oral se pueden formular utilizando portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica en dosificaciones adecuadas para la administración oral. Dichos portadores permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen en forma de comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones y similares, para la ingestión por parte del paciente.

30 Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener mediante una combinación de compuestos activos con un excipiente sólido, opcionalmente triturando la mezcla resultante y procesando dicha mezcla de gránulos, tras añadir sustancias auxiliares adecuadas, si se desea, a efectos de obtener comprimidos o grageas. Son recipientes adecuados sustancias de relleno de hidratos de carbono o proteínicas, tales como azúcares, incluyendo lactosa, sucrosa, manitol o sorbitol; almidón procedente de maíz, trigo, arroz, patata u otros vegetales; celulosas tales como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa de sodio; y gomas, incluyendo goma arábiga y tragacanto; y  
35 proteínas, tales como gelatina y colágeno. Si se desea, se pueden añadir agentes desintegrantes o solubilizantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar, ácido alginico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio.

40 Las grageas se disponen con recubrimientos adecuados, tales como soluciones concentradas de azúcar, que también pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los recubrimientos de comprimidos o grageas para la identificación del producto o a efectos de caracterizar la cantidad de compuesto activo, es decir, la dosificación.

45 Las preparaciones farmacéuticas que se pueden utilizar oralmente incluyen cápsulas duras realizadas en gelatina, así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un recubrimiento tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener ingredientes activos mezclados con una sustancia de relleno o agentes aglutinantes tales como lactosa o almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio, y opcionalmente estabilizantes. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden estar disueltos o suspendidos en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicol líquido, con o sin estabilizantes.

50 Las formulaciones farmacéuticas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas de compuestos activos. Para la inyección, las composiciones farmacéuticas según la presente invención se pueden formular en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, solución de Ringer o solución salina fisiológicamente tamponada. Las suspensiones acuosas de inyección pueden contener  
55 sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos se pueden preparar como suspensiones aceitosas de inyección apropiadas. Los disolventes o vehículos lipofílicos adecuados incluyen aceites grasos, tal como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tal como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos  
60 a efectos de permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

Para la administración tópica o nasal, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera particular que se debe permear. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

#### *Kits*

La presente invención se refiere además a paquetes y kits farmacéuticos que comprenden uno o más recipientes que contienen uno o más ingredientes de las composiciones anteriormente mencionadas según la presente invención. Dicho

recipiente o recipientes pueden ir acompañados de un prospecto con la forma prescrita por la agencia gubernamental responsable de regular la fabricación, el uso o la comercialización de productos farmacéuticos o biológicos, que refleje la aprobación por parte de dicha agencia de la fabricación, uso o comercialización del producto para su administración a seres humanos.

#### *Fabricación y almacenamiento*

Las composiciones farmacéuticas según la presente invención se pueden fabricar de un modo conocido en la técnica, por ejemplo, mediante procedimientos convencionales de mezclado, disolución, granulación, grageado, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

La composición farmacéutica se puede suministrar en forma de sal y se puede formar con muchos ácidos, incluyendo, sin limitarse a los mismos, ácido clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Las sales tienden a ser más solubles en disolventes acuosos u otros disolventes protónicos que son las correspondientes formas de base libre. En otros casos, la preparación preferente puede ser un polvo liofilizado en histidina 1 mM-50 mM, 0,1%-2% de sucrosa, 2%-7% de manitol a un intervalo de pH de 4,5 a 5,5 que se combina con un tampón antes de su utilización.

Después de que se hayan preparado composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto según la presente invención formuladas en un portador aceptable, las mismas se pueden introducir en un recipiente adecuado y etiquetarse para el tratamiento de una condición indicada. Para la administración de RG1, dicho etiquetado incluirá la cantidad, la frecuencia y el método de administración.

#### *Dosis terapéuticamente efectiva*

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su utilización en la presente invención incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad efectiva a efectos de alcanzar el propósito pretendido, es decir, el tratamiento de un estado de enfermedad particular caracterizado por la expresión de RG1. La determinación de una dosis efectiva resultará evidente para un experto en la materia.

Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente efectiva puede ser estimada inicialmente, ya sea en ensayos de cultivo celular, por ejemplo de células neoplásicas, o en modelos animales, habitualmente ratones, conejos, perros o cerdos. El modelo animal también se utiliza para alcanzar un intervalo deseable de concentración y una vía de administración. A continuación, dicha información puede ser utilizada a efectos de determinar dosis útiles y vías para la administración a seres humanos.

La expresión dosis terapéuticamente efectiva se refiere a la cantidad de proteína o sus anticuerpos, antagonistas o inhibidores que mejoran los síntomas o condición. La eficacia terapéutica y la toxicidad de dichos compuestos puede ser determinada mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, ED<sub>50</sub> (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población) y LD<sub>50</sub> (la dosis letal para el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos terapéutico y tóxico se designa índice terapéutico, y se puede expresar como la relación ED<sub>50</sub>/LD<sub>50</sub>. Resultan preferidas las composiciones farmacéuticas que presentan índices terapéuticos elevados. Los datos obtenidos a partir de ensayos de cultivo celular y estudios animales se utilizan en la formulación de un intervalo de dosificación para el uso en humanos. La dosificación de dichos compuestos está comprendida preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen el ED<sub>50</sub> con poca o ninguna toxicidad. La dosificación está comprendida en este intervalo en función de la forma de dosificación utilizada, la sensibilidad del paciente y la vía de administración.

La dosificación exacta es seleccionada por parte del médico individual a la vista del paciente que se debe tratar. La dosificación y administración se ajustan a efectos de proporcionar niveles suficientes del grupo activo o a efectos de mantener el efecto deseado. Otros factores que se pueden considerar incluyen la gravedad del estado de enfermedad, por ejemplo, el tamaño y la localización del tumor; la edad, el peso y el sexo del paciente; la dieta, la duración y frecuencia de administración, la combinación o combinaciones de fármacos, las sensibilidades a la reacción y la tolerancia/respuesta a la terapia. Las composiciones farmacéuticas de acción prolongada se pueden administrar cada 3 a 4 días, semanalmente, o una vez cada dos semanas, dependiendo de la vida media y la velocidad de eliminación de la formulación en particular.

Las cantidades normales de dosificación pueden estar comprendidas entre 0,1 y 100.000 microgramos, y hasta una dosis total de aproximadamente 1 g, dependiendo de la vía de administración. En la bibliografía se encuentran guías para las dosificaciones y métodos de administración particulares. Véanse las patentes US nº 4.657.760; nº 5.206.344; o nº 5.225.212. Los expertos en la materia utilizan diferentes formulaciones para los polinucleótidos que para las proteínas o sus inhibidores. De forma similar, la administración de polinucleótidos o polipéptidos será específica para células, condiciones, localizaciones particulares, etc.

La presente invención se describe con mayor detalle mediante los ejemplos siguientes. Dichos ejemplos se proporcionan únicamente a efectos de ilustrar la presente invención haciendo referencia a formas de realización específicas. Dichas ejemplificaciones, toda vez que ilustran determinados aspectos específicos de la presente invención, no constituyen limitaciones ni circunscriben el alcance de la invención dada a conocer en la presente memoria.

Todos los ejemplos se llevaron a cabo utilizando técnicas estándares, bien conocidas y rutinarias para los expertos en la materia, excepto donde se indica con todo detalle. Las técnicas rutinarias de biología molecular de los siguientes ejemplos se pueden llevar a cabo tal como se describe en los manuales estándares de laboratorio, tales como Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989.

#### Ejemplo 1

##### *Identificación de polinucleótido rg1 humano*

*Rg1* fue identificado como un gen expresado en la próstata explorando la base de datos Incyte's LifeSeq. la secuencia de nucleótidos fue identificada mediante una búsqueda de anotación de la base de datos, utilizando la herramienta "Protein Function" proporcionada por Incyte con el objetivo de realizar búsquedas en la base de datos. La secuencia de nucleótidos se encontró en la categoría de moléculas de adhesión celular en la base de datos anotada y fue descrita como un homólogo de F-spondin. El análisis Northern electrónico de la distribución de secuencias de polinucleótidos *rg1* en el conjunto de bibliotecas de la base de datos puso de manifiesto que *rg1* es expresado en niveles elevados en las bibliotecas prostáticas y en niveles menores en cierto número de otras bibliotecas de tejidos, incluyendo las de tejidos normales y tumorales.

Tras la disposición del conjunto de clones *rg1* de la base de datos en una secuencia contigua de polinucleótidos, y evitando la secuencia contigua, se identificó una secuencia de codificación de longitud completa en el polinucleótido ensamblado predicho. Dicha secuencia codificaba una proteína homóloga a F-spondin y a Mindin-2.

Se obtuvieron los clones Incyte 1640796, 1712252 y 1880265 a través de Incyte para el trabajo experimental y se identificó que el clon 3360733 contenía la mayoría de la secuencia de nucleótidos 5'. Dicho clon se secuenció completamente y contenía la secuencia de codificación completa para la proteína RG1 predecida. Dicha secuencia se muestra en la figura 1 (SEC ID n°: 1).

#### Ejemplo 2

##### *Expresión de ARNm rg1*

La expresión de ARNm *rg1* en una variedad de muestras de tejidos normales y tumorales, y en líneas celulares, se determinó por PCR semicuantitativa utilizando el ensayo Taqman (Perkin-Elmer). Se obtuvieron muestras de tejido prostático normal, benigno y tumoral que habían sido calificadas de acuerdo con un sistema de calificación Gleason modificado a través del Departamento de Urología de la Stanford University School of Medicine. Se aisló ARN a partir de dichas muestras mediante procedimientos estándar. Se adquirió ARN de otros tejidos tumorales y normales a través de fuentes comerciales, incluyendo Clontech y Biochain. Se obtuvieron líneas celulares prostáticas tumorales (PC-3, LNCaP y DU145) a través de la American Type Culture Collection y se propagaron en cultivo mediante métodos estándares, utilizando un medio con contenido en suero. Los tumores de xenotransplante derivados de estas líneas celulares se establecieron en ratones inmunodeficientes y se recolectaron de dichos ratones aproximadamente 4-6 semanas tras la implantación. Se aisló ARN a partir de los tumores mediante procedimientos estándares.

Se llevó a cabo un análisis por PCR basado en Taqman utilizando los cebadores: CGC GCA TAG CTC CGA CTA C (SEC ID n°: 3) y GCC GCG TCC GCA AAG (SEC ID n°: 4) y la sonda Taqman: 6-FAM-AGG AAG AAC CAG TAC GTC AGT AAC GGG CTG-Tamra (SEC ID n°: 5).

Dichos cebadores y dichas sondas se diseñaron utilizando el software Perkin Elmer's Primer Express y fueron sintetizados por Synthetic Genetics. Las reacciones PCR se llevaron a cabo durante 30-40 ciclos y se cuantificaron utilizando ARN prostático a efectos de generar una curva estándar para la comparación relativa. Este análisis puso de manifiesto que el ARNm *rg1* se detectó en la abundancia más elevada en la próstata y en niveles significativamente menores en diversos otros tejidos (véase figura 5).

#### Ejemplo 3

##### *Clonación y expresión de RG1 en células BHK*

La región de codificación de RG1 se obtuvo por el plásmido 3360733 de Incyte. La secuencia de codificación se amplificó por PCR con los cebadores SST115 (5'-TCCCTCTAGAGCCACCATGGAAAACCCAGCCCGGC-3') (SEC ID n°: 6) y SST113 (5'-AAGGCATCACGTGTTAGACGCAGTTATCAGGGACG-3') (SEC ID n°: 7) en una reacción PCR estándar (100 µl) utilizando tampón de polimerasa 1x Pfu Turbo (Stratagene, La Jolla, CA)/200 µM dNTPs/0,2 µM cebadores de oligonucleótidos/2,5 U Pfu Turbo polimerasa (Stratagene). Las condiciones de amplificación por PCR fueron las siguientes: 3 min a 95°C (15 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, 2 minutos a 72°C) x35, 72°C durante 7 minutos. El producto amplificado por PCR resultante se purificó utilizando una columna de PCR QIAquick (Qiagen, Valencia, CA) y se digirió con las enzimas de restricción XbaI y PmlI a efectos de obtener un fragmento de 1010 bp que se purificó en un gel de agarosa 1% utilizando un kit BIO 101 GeneClean (Vista, CA). El

fragmento purificado se ligó (utilizando Epicentre Fast Link Kit, (Epicenter, Madison, WI)) al vector de expresión Sindbis no citopático pSINrep21 (Agapov *et al.*, 1998, PNAS 95: 12989-12994), se digirió con XbaI y PmlI y se transformó en células competentes DH5-alfa (Life Technologies, Gaithersburg, CA) y se seleccionaron sobre placas de agar LB que contenían ampicilina (100 µg/ml). Una colonia resistente a ampicilina de este tipo se cultivó en medio LB con ampicilina y mediante análisis de secuencias se mostró que contenía la secuencia de codificación de RG1 insertada. Este plásmido se designó pPEG6.

Dos microgramos de pPEG6 se utilizaron para transfectar  $1-3 \times 10^5$  células renales de bovino-hamster (BHK) utilizando reactivo Lipofectamina Plus (Life Technologies, Gaithersburg, MD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras la transfección, las células se incubaron en DMEM más suero sanguíneo fetal durante 24-48 horas, momento en el que las células se separaron de 1 a 10 y se inició la selección para las células que contenían el plásmido añadiendo puromicina (2,5 µg/ml de concentración final) y DMEM que contenía suero. después de que las células fueran confluentes (4-5 días tras la adición de puromicina), las mismas se lavaron con PBS, se separaron de 1 a 10, se añadió medio DMEM con suero y se añadieron 5 µg/ml de puromicina. Tras 2-3 días adicionales, el medio se substituyó por DMEM y 5 µg/ml de puromicina sin suero, se cultivó durante 2-3 días y se detectó la presencia de proteína RG1 en el medio mediante análisis Western utilizando anticuerpos RG1. La proteína RG1 se detectó en un nivel de 1 µg/ml.

#### Ejemplo 4

##### *Generación de anticuerpos*

Se generaron antisueros policlonales de conejo contra cinco secuencias polipeptídicas sintéticas derivadas de la secuencia proteínica de RG1. Dichas secuencias se seleccionaron debido a sus posiciones parecidas en la superficie de la proteína, a efectos de generar antisueros que reconozcan con mayor probabilidad epítopes de superficie. Los residuos de cisteína se substituyeron por ácido aminobutírico (Abu) a efectos de ayudar a la síntesis. A continuación se indican las secuencias de aminoácidos específicas, las posiciones sobre la proteína RG1 y las designaciones para los cinco péptidos.

<i>Designación</i>	<i>Posición</i>	<i>Secuencia de aminoácidos</i>
C	28-46	PLGGESICSAGAPAKYSIT (SEC ID nº: 8)
2C	46-64	TFTGKWSQTAFPKQYPLFR (SEC ID nº: 9)
3C	77-91	HSSDYSMWRKNQYVS (SEC ID nº: 10)
4C	188-210	DAGTDSGFTFSSPNFATIPODTV (SEC ID nº: 11)
5C	263-274	NEIVDSASVPET (SEC ID nº: 12)

Los péptidos se acoplaron covalentemente a hemocianina de lapa californiana (KLH) a través de una cisteína carboxi terminal adicional para su utilización como inmunógenos. De forma similar, se preparó un conjugado de albúmina de suero bovino (BSA) para el análisis de titulaciones de antisuero a través de ELISA.

Se inmunizaron dos animales para cada péptido. Se llevaron a cabo inmunizaciones iniciales en adyuvante completo de Freund (0,5 mg/animal), seguido de refuerzos en intervalos de tres semanas con 0,25 mg/animal en adyuvante incompleto de Freund aplicados por vía intramuscular. Se realizaron extracciones de ensayo periódicas y las titulaciones de anticuerpos contra el conjugado específico de péptido de BSA se midieron mediante ELISA y se compararon con suero preinmune. Se puso de manifiesto que los antisueros contra los péptidos 1C y 3C eran activos. Los antisueros contra el péptido 2C no reconocieron el polipéptido RG1. Los antisueros contra los péptidos 4C y 5C no se ensayaron.

Se generaron anticuerpos monoclonales humanos contra RG1 inmunizando ratones transgénicos contra péptidos RG1 y una proteína de fusión RG1 marcada con 6-histidina expresada en *E. coli*. Los esplenocitos de estos animales se fusionaron con células de mieloma a efectos de producir células de hibridomas. Los hibridomas resultantes se sometieron a barrido por ELISA para los que producían anticuerpos dirigidos contra los péptidos y la proteína RG1.

#### Ejemplo 5

##### *Análisis Western blot de anticuerpos*

Se analizaron antisueros por Western blotting a efectos de determinar su especificidad a RG1. Los antisueros específicos a RG1 (los que reaccionan contra las secuencias 1C y 3C, véase anteriormente) se ensayaron en RG1 temporalmente expresado en células COS, RG1 nativo secretado de células LNCaP y RG1 producido a partir de células renales de cría de hámster (BHK) transfectadas. Se ensayaron además antisueros específicos a RG1 sobre lisados preparados a partir de: tumores LNCaP, células LNCaP, tumores PC3, células PC3 y diversas muestras clínicas de tumores prostáticos humanos. Se lisaron células y tejidos en tampón detergente. Tras hervir durante 5 min, se cargaron 10 µl de cada lisado en un gel de SDS-poliacrilamida 12% a efectos de separar las proteínas. A continuación,

las proteínas separadas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La especificidad de enlace de los anticuerpos RG1 fue verificada por enlazamiento en presencia de los péptidos homólogos y heterólogos. los antisueros específicos a RG1 pudieron detectar la proteína en todas las muestras menos en células PC-3 y tumores PC-3.

5

## Ejemplo 6

*Purificación de proteína RG1 nativas secretada por células LNCaP*

10 Se puso de manifiesto que células LNCaP reproducidas en cultivo segregan proteína RG1 nativa por análisis Western blotting. A efectos de purificar la proteína nativa, se cultivaron células durante 48 horas en medio desprovisto de suero. Dicho medio acondicionado desprovisto de suero se recolectó, se centrifugó a efectos de eliminar las células y se concentró aproximadamente cincuenta veces por ultrafiltración. A continuación, el medio concentrado se diluyó diez veces con tampón de acetato de sodio 20 mM, pH 6,5, y se cargó en una columna de intercambio aniónico de Q-Sefarosa. La elución de la columna consistía en un gradiente de cloruro de sodio (0,5% por minuto) al recoger fracciones de 2,0 ml. La proteína RG1 eluyó aproximadamente a NaCl 75 mM, tal como se determinó mediante Western blot y SDS PAGE. La proteína RG1 nativa discurre a un peso molecular ligeramente menor que la proteína de fusión 6-histidina-RG1 expresada en bacterias, presumiblemente porque está desprovista del péptido de fusión.

20

## Ejemplo 7

*Tinción inmunohistoquímica de expresión de RG1*

25 La expresión de la proteína RG1 se determinó mediante LifeSpan Biosciences, Inc. en una variedad de tejidos humanos, incluyendo riñón, pulmones, páncreas, músculo, cerebro y próstata. Se obtuvieron tejidos prostáticos adicionales a través del departamento de urología de la escuela universitaria de Stanford y se analizaron en Berlex. Las secciones de tejido se desparafinaron utilizando procedimientos estándar. El anticuerpo policlonal RG1-3C se utilizó como anticuerpo primario y el sistema de detección consistió en utilizar el kit de vector ABC-AP (AK5002) con un kit de vector de sustrato rojo (Sk5002). Como control negativo, la tinción se llevó a cabo en ausencia del anticuerpo primario.

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

5 1. Anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo, que se enlaza específicamente a un fragmento de polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que es completamente igual a parte pero no a la totalidad de la secuencia de aminoácidos del polipéptido RG1 tal como se presenta en la figura 2 (SEC ID nº: 2), y sus variantes o derivados, en el que dicho anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo, se enlaza específicamente a un miembro seleccionado de entre el grupo constituido por:

- 10 (a) aminoácido 28 a aminoácido 46 de SEC ID nº: 2; y  
(b) aminoácido 188 a aminoácido 210 de SEC ID nº: 2.

15 2. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se enlaza específicamente a la secuencia de aminoácidos PLGGESICSAGAPAKYSIT (SEC ID nº: 8).

3. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo se enlaza específicamente a la secuencia de aminoácidos DAGTDSGFTFSSPNFATIPQDTV (SEC ID nº: 11).

20 4. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo es un anticuerpo policlonal.

5. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

25 6. Inmunoconjugado que comprende un anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo, tal como se define en la reivindicación 1, conjugado con un agente terapéutico.

7. Inmunoconjugado según la reivindicación 6, en el que el agente terapéutico es un agente citotóxico.

30 8. Inmunoconjugado según la reivindicación 7, en el que el agente citotóxico se selecciona de entre el grupo constituido por ricina, doxorubicina, daunorrubicina, taxol, bromuro de etidio, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, dihidroxiantracendiona, actinomicina D, toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas* (PE) A, PE40, ricina, abrina, glucocorticoide y radioisótopos.

35 9. Inmunoconjugado según la reivindicación 6, en el que los fragmentos de anticuerpo se seleccionan de entre el grupo constituido por fragmentos Fv, F(ab') y F(ab')<sub>2</sub>.

40 10. Utilización de un inmunoconjugado que comprende un agente terapéutico y un anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo, que se enlaza específicamente a un fragmento de polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que es completamente igual a parte pero no a la totalidad de la secuencia de aminoácidos del polipéptido RG1, tal como se presenta en SEC ID nº: 2, y sus variantes o derivados, en la que dicho anticuerpo aislado o fragmento de anticuerpo, se enlaza específicamente a un miembro seleccionado de entre el grupo constituido por:

- 45 (a) aminoácido 28 a aminoácido 46 tal como se presenta en SEC ID nº: 2;  
(b) aminoácido 77 a aminoácido 91 tal como se presenta en SEC ID nº: 2;  
(c) aminoácido 188 a aminoácido 210 tal como se presenta en SEC ID nº: 2; y  
50 (d) aminoácido 263 a aminoácido 274 tal como se presenta en SEC ID nº: 2,

para preparar una composición para destruir selectivamente una célula que expresa el polipéptido RG1 de SEC ID nº: 2 haciendo reaccionar el inmunoconjugado con la célula, de manera que el agente terapéutico del inmunoconjugado puede destruir la célula.

55 11. Utilización de una cantidad terapéuticamente efectiva de un inmunoconjugado que comprende un agente terapéutico y un anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo, que se enlaza específicamente a un fragmento de polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que es completamente igual a parte pero no a la totalidad de la secuencia de aminoácidos del polipéptido RG1, tal como se presenta en la figura 2 (SEC ID nº: 2), y sus variantes o derivados, en la que dicho anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo, se enlaza específicamente a un miembro seleccionado de entre el grupo constituido por:

- 60 (a) aminoácido 28 a aminoácido 46 tal como se presenta en SEC ID nº: 2;  
65 (b) aminoácido 77 a aminoácido 91 tal como se presenta en SEC ID nº: 2;  
(c) aminoácido 188 a aminoácido 210 tal como se presenta en SEC ID nº: 2; y

## ES 2 331 106 T3

(d) aminoácido 263 a aminoácido 274 tal como se presenta en SEC ID n°: 2,

para preparar una composición para tratar un estado de enfermedad en un paciente humano, estando asociado dicho estado de enfermedad a la expresión de RG1.

12. Utilización según la reivindicación 10 u 11, en la que el anticuerpo se enlaza específicamente a la secuencia de aminoácidos PLGGESICSAGAPAKYSIT (SEC ID n°: 8).

13. Utilización según la reivindicación 10 u 11, en la que el anticuerpo se enlaza específicamente a la secuencia de aminoácidos HSSDYSMWRKNQYVS (SEC ID n°: 10).

14. Utilización según la reivindicación 10 u 11, en la que el anticuerpo se enlaza específicamente a la secuencia de aminoácidos DAGTDSGFTFSSPNFATIPQDTV (SEC ID n°: 11).

15. Utilización según la reivindicación 10 u 11, en la que el anticuerpo se enlaza específicamente a la secuencia de aminoácidos NEIVDSASVPET (SEC ID n°: 12).

16. Procedimiento de detección, en el que el procedimiento comprende analizar una muestra derivada de un huésped la presencia de un polipéptido que comprende un miembro seleccionado entre el grupo constituido por:

(a) un polipéptido que comprende el aminoácido 28 al aminoácido 46 tal como se presenta en SEC ID n°: 2; y

(b) un polipéptido que comprende el aminoácido 188 al aminoácido 210 tal como se presenta en SEC ID n°: 2,

en el que el análisis comprende poner en contacto la muestra con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, tal como se define según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que se enlaza específicamente a uno de los polipéptidos, y detectar el enlazamiento del anticuerpo al polipéptido en la muestra.

17. Utilización de un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, que se enlaza específicamente a un fragmento de polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que es completamente igual a parte pero no a la totalidad de la secuencia de aminoácidos del polipéptido RG1, tal como se presenta en SEC ID n°: 2, y sus variantes o derivados, en la que dicho anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo, se enlaza específicamente a un miembro seleccionado de entre el grupo constituido por:

(a) aminoácido 28 a aminoácido 46 tal como se presenta en SEC ID n°: 2;

(b) aminoácido 77 a aminoácido 91 tal como se presenta en SEC ID n°: 2;

(c) aminoácido 188 a aminoácido 210 tal como se presenta en SEC ID n°: 2; y

(d) aminoácido 263 a aminoácido 274 tal como se presenta en SEC ID n°: 2,

para preparar una composición para diagnosticar en un sujeto una metástasis asociada con el polipéptido de SEC ID n°: 2.

18. Utilización de un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, que se enlaza específicamente a un fragmento de polipéptido que presenta una secuencia de aminoácidos que es completamente igual como parte pero no en su totalidad de la secuencia de aminoácidos del polipéptido RG1, tal como se presenta en SEC ID n°: 2, y sus variantes o derivados, en la que dicho anticuerpo aislado, o fragmento de anticuerpo, se enlaza específicamente a un miembro seleccionado de entre el grupo constituido por:

(a) aminoácido 28 a aminoácido 46 tal como se presenta en SEC ID n°: 2;

(b) aminoácido 77 a aminoácido 91 tal como se presenta en SEC ID n°: 2;

(c) aminoácido 188 a aminoácido 210 tal como se presenta en SEC ID n°: 2; y

(d) aminoácido 263 a aminoácido 274 tal como se presenta en SEC ID n°: 2,

para preparar una composición para detectar la metástasis de cáncer de próstata en un sujeto.

19. Utilización según la reivindicación 17 ó 18, en la que el anticuerpo se enlaza específicamente a la secuencia de aminoácidos PLGGESICSAGAPAKYSIT (SEC ID n°: 8).

## ES 2 331 106 T3

20. Utilización según la reivindicación 17 ó 18, en la que el anticuerpo se enlaza específicamente a la secuencia de aminoácidos HSSDYSMWKRKNQYVS (SEC ID n°: 10).

5 21. Utilización según la reivindicación 17 ó 18, en la que el anticuerpo se enlaza específicamente a la secuencia de aminoácidos DAGTDSGFTFSSPNFATIPQDTV (SEC ID n°: 11).

22. Utilización según la reivindicación 17 ó 18, en la que el anticuerpo se enlaza específicamente a la secuencia de aminoácidos NEIVDSASVPET (SEC ID n°: 12).

10 23. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22, en la que la composición está destinada a metodologías de formación de imagen.

15 24. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 22, en la que la composición está destinada a la inmunoescintigrafía con anticuerpo anti-RG1 conjugado con Tc-99m, o anticuerpo anti-RG1 conjugado con In-111.

25. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 24, en la que el anticuerpo se etiqueta con el fin de generar directa o indirectamente una señal detectable con un compuesto seleccionado de entre el grupo constituido por un marcador radiactivo, una enzima, un cromóforo o un agente fluorescente.

20 26. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 17 a 25, en la que el anticuerpo se etiqueta con un marcador detectable o se conjuga con una segunda molécula con el fin de dirigir la segunda molécula a una célula positiva a RG1.

25 27. Utilización según la reivindicación 26, en la que la segunda molécula es un agente citotóxico seleccionado entre el grupo constituido por ricina, doxorrubicina, daunorrubicina, Taxol® (paclitaxel), bromuro de etidio, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, dihidroxiantracendiona, actinomicina D, toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas* (PE) A, PE40, ricina, abrina y glucocorticoide.

30 28. Utilización según la reivindicación 26, en la que el marcador detectable se selecciona de entre el grupo constituido por antimonio-124, antimonio-125, arsénico-74, bario-103, bario-140, berilio-7, bismuto-j206, bismuto-207, cadmio-109, cadmio-115m, calcio-45, cerio-139, cerio-141, cerio-144, cesio-137, cromo-51, cobalto-56, cobalto-57, cobalto-58, cobalto-60, cobalto-64, erbio-169, europio-152, gadolinio-153, oro-195, oro-199, hafnio-175, hafnio-181, indio-111, yodo-123, yodo-131, iridio-192, hierro-55, hierro-59, criptón-85, plomo-210, lutecio-177, manganeso-54, mercurio-197, mercurio-203, molibdeno-99, neodimio-147, neptunio-237, níquel-63, niobio-95, osmio-185+191, paladio-103, platino-195m, praseodimio-143, prometio-147, protactinio-233, radio-226, renio-186, rubidio-86, rutenio-103, rutenio-106, escandio-44, escandio-46, selenio-75, plata-110m, sodio-22, estroncio-85, estroncio-89, estroncio-90, azufre-35, tántalo-182, tecnecio-99m, telurio-125, telurio-132, talio-170, talio-204, torio-228, torio-232, estaño-113, titanio-44, tungsteno-185, vanadio-48, vanadio-49, iterbio-169, itrio-88, itrio-90, itrio-'91, zinc-65 y zirconio-95.



## FIGURA 1

1 AGAAAGGGGT GCGGCAGCAC TCCAGGGGA AGAGGGTGAT CCGACCCGGG  
 51 GAAGGTCGCT GGGCAGGGCG AGTTGGGAAA GCGGCAGCCC CCGCCGCCCC  
 101 CGCAGCCCCT TCTCCTCCTT TCTCCACGT CCTATCTGCC TCTCGCTGGA  
 151 GGCCAGGCCG TGCAGCATCG AAGACAGGAG GAACTGGAGC CTCATTGGCC  
 201 GGCCCGGGGC GCCGGCCTCG GGCTTAAATA GGAGCTCCGG GCTCTGGCTG  
 251 GGACCCGACC GCTGCCGGCC GCGCTCCCGC TGCTCCTGCC GGGTGATGGA  
 301 AAACCCAGC CCGGCCGCCG CCCTGGGCAA GGCCCTCTGC GCTCTCCTCC  
 351 TGGCCACTCT CGGCGCCGCC GGCCAGCCTC TTGGGGGAGA GTCCATCTGT  
 401 TCCGCCGGAG CCCC GGCCAA ATACAGCATC ACCTTCACGG GCAAGTGGAG  
 451 CCAGACGGCC TTCCCAAGC AGTACCCCT GTTCCGCCCC CCTGCGCAGT  
 501 GGTCTTCGCT GCTGGGGGCC GCGCATAGCT CCGACTACAG CATGTGGAGG  
 551 AAGAACCAGT ACGTCAGTAA CGGGCTGCGC GACTTTGCGG AGCGCGGGCA  
 601 GGCCCTGGGCG CTGATGAAGG AGATCGAGGC GGCGGGGGAG GCGCTGCAGA  
 651 GCGTGACGCG GGTGTTTTTC GCGCCCGCCG TCCCAGCGG CACCGGGCAG  
 701 ACGTCGGCGG AGCTGGAGGT GCAGCGCAGG CACTCGCTGG TCTCGTTTGT  
 751 GGTGCGCATC GTGCCAGCC CCGACTGGTT CGTGGGCGTG GACAGCCTGG  
 801 ACCTGTGCGA CGGGGACCGT TGGCGGGAAC AGGCGGCGCT GGACCTGTAC  
 851 CCCTACGACG CCGGGACGGA CAGCGGCTTC ACCTTCTCCT CCCCCAATT  
 901 CGCCACCATC CCGCAGGACA CCGTGACCGA GATAACGTCC TCCTCTCCCA  
 951 GCCACCCGGC CAACTCCTTC TACTACCCAC GGCTGAAGGC CCTGCCTCCC  
 1001 ATCGCCAGGG TGACACTGGT GCGGCTGCGA CAGAGCCCCA GGGCCTTCAT  
 1051 CCCTCCCGCC CCAGTCCTGC CCAGCAGGGA CAATGAGATT GTAGACAGCG  
 1101 CCTCAGTTCC AGAAACGCCG CTGGACTGCG AGGTCTCCCT GTGGTCGTCC  
 1151 TGGGGACTGT GCGGAGGCCA CTGTGGGAGG CTCGGGACCA AGAGCAGGAC  
 1201 TCGCTACGTC CGGGTCCAGC CCGCCAACAA CGGGAGCCCC TGCCCCGAGC  
 1251 TCGAAGAAGA GGCTGAGTGC GTCCCTGATA ACTGCGTCTA AGACCAGAGC

**FIGURA 1- continuación**

```

1301  CCCGCAGCCC CTGGGGCCCC CCGGAGCCAT GGGGTGTCGG GGGCTCCTGT
1351  GCAGGCTCAT GCTGCAGGCG GCCGAGGGCA CAGGGGGTTT CCGCTGCTC
1401  CTGACCGCGG TGAGGCCGCG CCGACCATCT CTGCACTGAA GGGCCCTCTG
1451  GTGGCCGGCA CGGGCATTGG GAAACAGCCT CCTCCTTTCC CAACCTTGCT
1501  TCTTAGGGGC CCCCGTGTCC CGTCTGCTCT CAGCCTCCTC CTCCTGCAGG
1551  ATAAAGTCAT CCCCAAGGCT CCAGCTACTC TAAATTATGT CTCCTTATAA
1601  GTTATTGCTG CTCCAGGAGA TTGTCCTTCA TCGTCCAGGG GCCTGGCTCC
1651  CACGTGGTTG CAGATACCTC AGACCTGGTG CTCTAGGCTG TGCTGAGCCC
1701  ACTCTCCCGA GGGCGCATCC AAGCGGGGGC CACTTGAGAA GTGAATAAAT
1751  GGGGCGGTTT CGGAAGCGTC AAAAAAAAAA AAAAA

```

**FIGURA 2**

1 MENPSPAAAL GKALCALLLA TLGAAGQPLG GESICSAGAP AKYSITETGK  
51 HSQTAEPKOY PLERPPAOWS SLIGAAHSSD YSMWRKNOYV SNGLRDEAER  
101 GEAWALMKEI EAAGEALQSV HAVFSAPAVP SGTGQTSACL EVORRHSLYS  
151 FVVRIVPSPD WFGVDSLDL CDGDRWREOA ALDLYPYDAG TDSGETESSP  
201 NEATIPODTV TEITSSSPSH PANSFYYPRL KALPPIARVT LVRLRQSPRA  
251 FIPPAPVLPS RDNEIVDSAS VPETPLDCEV SLWSSWGICG GHCGRIGTKS  
301 RTRYVRVOPA NNGSPCPELE EEAECVPDNC V

## FIGURA 3

```

RG1      1 MENPSPAAALGKALCALLLATLGA.AGQPLGGESICSAGAPAKYSITFTG 49
      ||| | .| : | ||| ||. ||||| ||:|. | | :||| |||
mindin 1 MENVS..FSLDRTLWVFLAMLGSTAGQPLGGESVCTARPLARYSITFTG 48

      50 KWSQTAFPKQYPLFRPPAQWSSLLGAAHSSDYSMWRKNQYVSNGLRDFAE 99
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
      49 KWSQTAFPKQYPLFRPPAQWSSLLGAAHSSDYSMWRKNEYVSNGLRDFAE 98

      100 RGEAWALMKEIEAAGEALQSVHAVFSAPAVPSGTGQTSAELEVQRRHSLV 149
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
      99 RGEAWALMKEIEAAGEKLQSVHAVFSAPAVPSGTGQTSAELEVHPRHSLV 148

      150 SFVVRIVPSPDWFVGVDSLDCDGRWREQAALDLYPYDAGTDSGFTFSS 199
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
      149 SFVVRIVPSPDWFVGIDSLDCEGGRWKEQVVL DLYPHDAGTDSGFTFSS 198

      200 PNFATIPQDTVTEITSSSPSHPANSFYYPRLKALPPIARVTLVRLRQSPR 249
      ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
      199 PNFATIPQDTVTEITASSPSHPANSFYYPRLKSLPPIAKVTFVRLRQSPR 248

      250 AFIPPAPVLP SRDNEIVDSASVPETPLDCEVSLWSSWGLCGGHCGRLGTK 299
      || ||. | || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
      249 AFAPPSLDLASRGNEIVDSL SVPETPLDCEVSLWSSWGLCGGPCGKLGAK 298

      300 SRTRYVRVQPANNGSPCPELEEEAECVPDNCV 331
      ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
      299 SRTRYVRVQPANNGTPCPELEEEAECAPDNCV 330

```

### FIGURA 4

[illegible]

## FIGURA 4 - continuación

```

721 GCAGCGCAGGCACTCGCTGGTCTCGTTTGTGGTGCGCATCGTGCCAGCCCCGACTGGTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 780
CGTCGCGTCCGTGAGCGACAGAGCAAACACCACGCGTAGCACGGGTGCGGGGCTGACCAA

b   Q R R H S L V S F V V R I V P S P D W F -

781 CGTGGGCGTGGACAGCCTGQACCTGTGCGACGGGGACCGTTGGCGGGAACAGGCGGCGCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 840
GCACCCGCACTGTGCGACCTGGACACGCTGCCCTGGCAACCGCCCTGTGTCGCCCGGA

b   V G V D S L D L C D G D R W R E Q A A L -

841 GGACCTGTACCCCTACGACGCCGGGACGGACAGCGGCTTCACCTTCTCCTCCCCAACTT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 900
CCTGGACATGGGGATGCTGCCGGCCCTGCCTGTGCGCGAAGTGAAGAGGAGGGGGTTGAA

b   D L Y P Y D A G T D S G F T F S S P N F -

901 CGCCACCATCCCGCAGGACACGGTGACCGAGATAACGTCTCTCTCCAGCCACCCGGC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
CGGGTGGTAGGGCTCTGTGCCACTGGCTCTATTGCAGGAGGAGAGGGTGGGTGGGGCG

b   A T I P Q D T V T E I T S S S P S H P A -

961 CAACTCCTTCTACTACCCACGGCTGAAGGCCCTGCCTCCCATCGCCAGGGTGACACTGGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
GTTGAGGAAGATGATGGGTGCCGACTTCGGGGACGGAGGGTAGCGGTCCCACTGTGACCA

b   N S F Y Y P R L K A L P P I A R V T L V -

1021 GCGGCTGCGACAGAGCCCCAGGGCCCTTCATCCCTCCCGCCCCAGTCTGCCCAGCAGGGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
CGCCGACGCTGTCTCGGGTCCCGGAAGTAGGGAGGGCGGGGTCAGGACGGGTGCTCCCT

b   R L R Q S P R A F I P P A P V L P S R D -

1081 CAATGAGATTGTAGACAGCGCCTCAGTTCCAGAAACGCCGCTGGACTGCGAGGTCTCCCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
GTTACTCTAACATCTGTCCGGAGTCAAGGTCTTTGCGGCGACCTGACGCTCCAGAGGGA

b   N E I V D S A S V P E T P L D C E V S L -

1141 GTGGTCTGCTCGGGGACTGTGCGGAGGCCACTGTGGGAGGCTCGGGACCAAGAGCAGGAC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
CACCAGCAGGACCCCTGACACGCTCCGGTGACACCTCCGAGCCCTGGTTCTGCTCCTG

b   W S S W G L C G G H C G R L G T K S R T -

1201 TCGCTACGTCCGGGTCCAGCCCCGCAACAAACGGGAGCCCTGCCCCGAGCTCGAAGAAGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
AGCGATGCAGGCCAGGTCCGGGCGGTTGTTGCCCTCGGGGACGGGGCTCGAGCTTCTTCT

b   R Y V R V Q P A N N G S P C P E L E E E -

1261 GGCTGAGTGGTCCCTGATAACTGCGTCTAAGACCAGAGCCCCGACGCCCTGGGGCCCC
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
CCGACTCACGCAGGGACTATTGACGCAGATTCTGGTCTCGGGGCGTGGGGACCCCGGGG

b   A E C V P D N C V *

1321 CCGGAGCCATGGGGTGTGCGGGGCTCCTGTGACGGCTCATGCTGCAGGCGGCGGAGGGCA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
GGCCTCGGTACCCACAGCCCCGAGGACACGTCCGAGTACGACGTCCGCCGGCTCCCGT

1381 CACGGGGTTTTCGGCTGCTCCTGACCGCGGTGAGGCCGCGCCGACCATCTCTGCACTGAA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
GTCCCCCAAAGCGCGACGAGGACTGCCGCCACTCCGGCGCGGCTGGTAGAGACGTGACTT

1441 GGGCCCTCTGGTGGCCGGCACGGGCATTGGGAAACAGCCTCCTCTTTCCCAACCTTGCT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
CCCCGAGACCACCGCCGTCGCCCTTAACCTTTGTGCGAGGAGGAAAGGTTGGAACCA

```

FIGURA 4 - continuación

```

1501 TCTTAGGGGCCCCCGTGTCCCGTCTGCTCTCAGCCTCCTCCTCCTGCAGGATAAAGTCAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560
AGAATCCCCGGGGGCACAGGCCAGACGAGAGTCGGAGGAGGAGGACGTCCTATTTTCAGTA

CCCCAAGGCTCCAGCTACTCTAAATTATGTCTCCTTATAAGTTATTGCTGCTCCAGGAGA
1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620
GGGGTTCCGAGGTCGATGAGATTTAATACAGAGGAATATTCAATAACGACGAGGTCCTCT

TTGTCCTTCATCGTCCAGGGGCCTGGCTCCACGTTGGTTGCAGATACCTCAGACCTGGTG
1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680
AACAGGAAGTAGCAGGTCCCCGACCGAGGGTGCACCAACGTCTATGGAGTCTGGACCAC

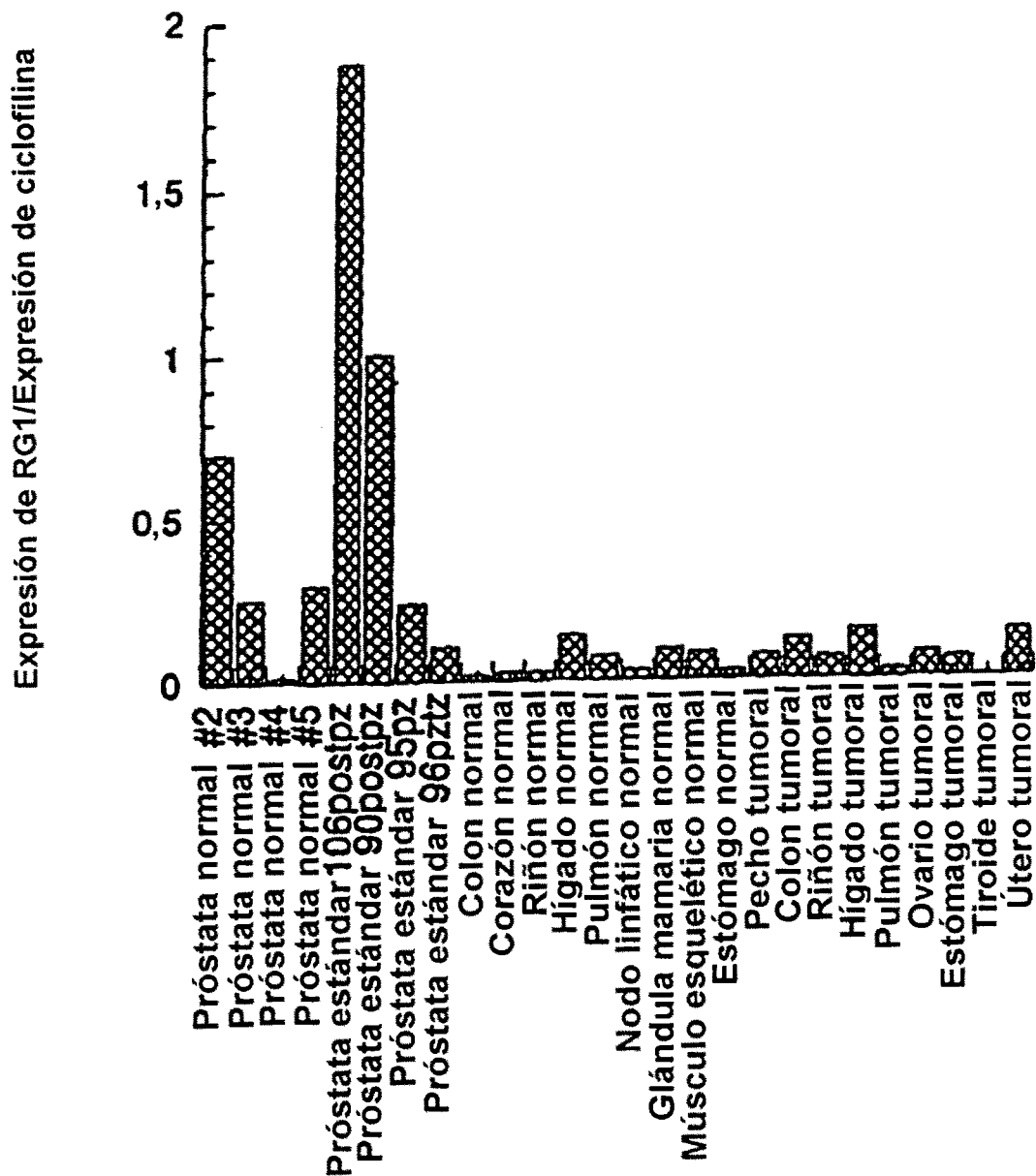
CTCTAGGCTGTGCTGAGCCCACTCTCCCGAGGGCGCATCCAAGCGGGGGCCACTTGAGAA
1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740
GAGATCCGACACGACTCGGGTGAGAGGGCTCCCGCGTAGGTTGCCCCCGGTGAACTCTT

GTGAATAAATGGGGCGGTTTCGGAAGCGTC
1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1770
CACTTATTTACCCCGCCAAAGCCTTCGCAG

```

FIGURA 5

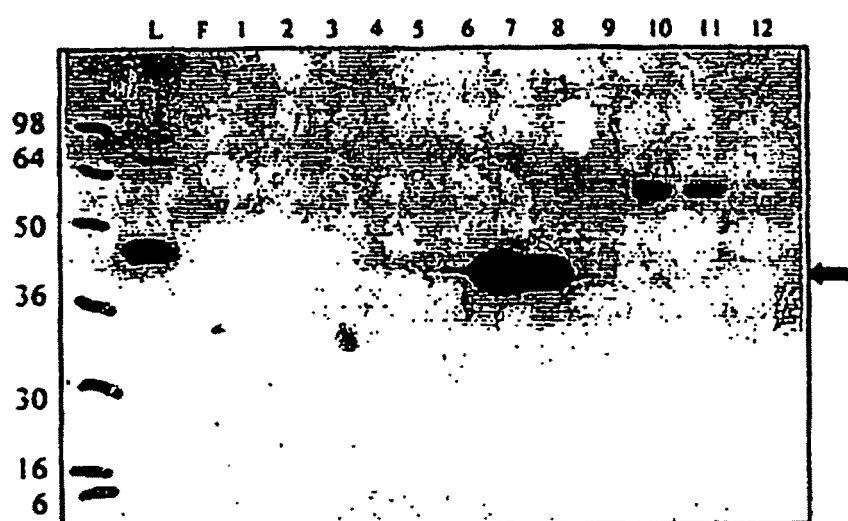
Expresión de ARNm *Rg1*  
en tejidos humanos



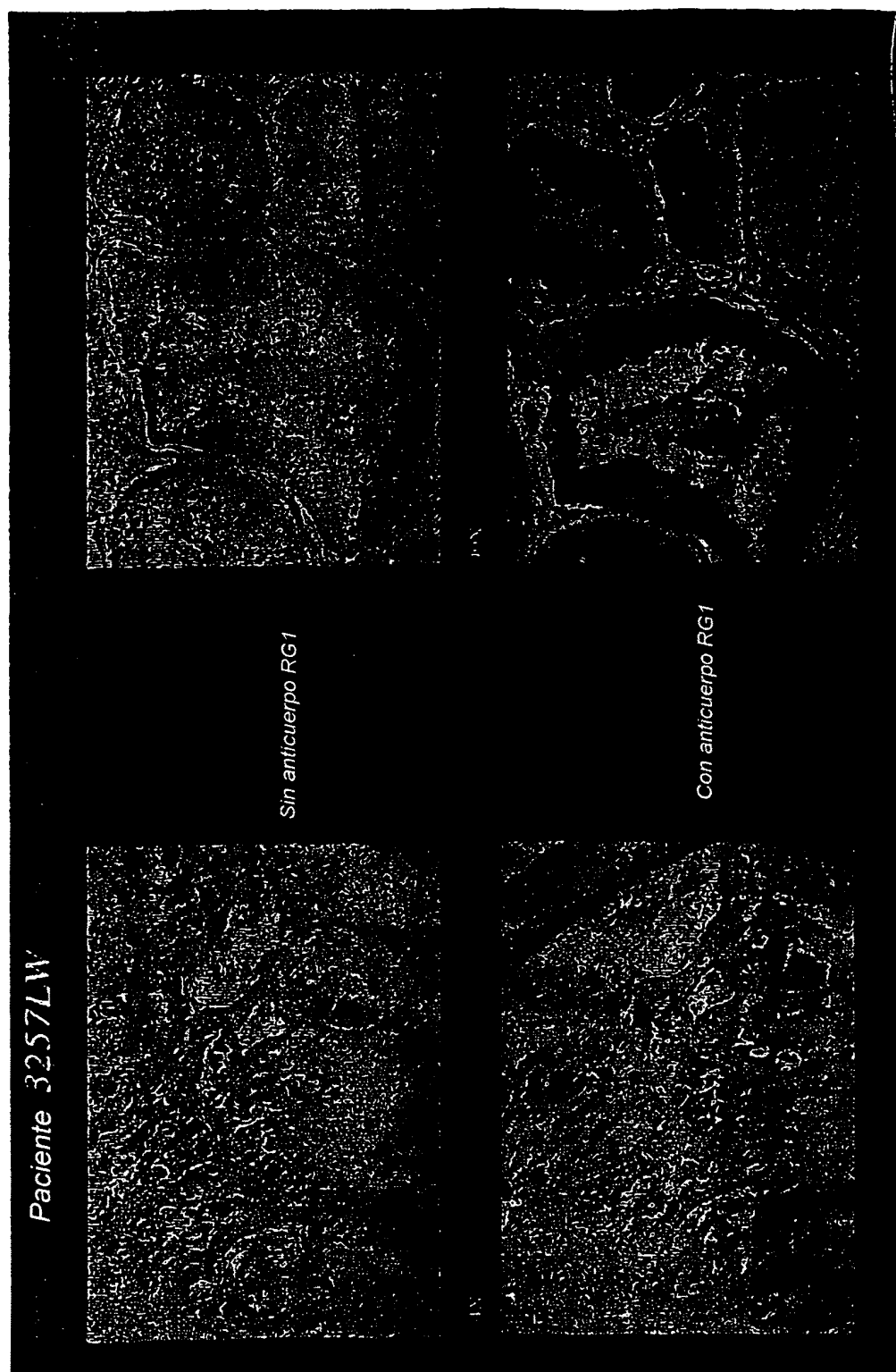


**FIGURA 6**

**Purificación de proteína nativa RG1  
secretada por células LNCaP**



**FIGURA 7**  
Tinción inmunohistoquímica de  
expresión de RG1



# ES 2 331 106 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Harkins, Richard  
 Parkes, Deborah  
 5 Parry, Gordon  
 Schneider, Douglas  
 Steinbrecher, Renate

<120> ADN que codifica un nuevo polipéptido RG1  
 10

<130> 51791AUSM1

<140>  
 15 <141>

<150> 60/172,370  
 20 <151> 1999-12-16

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.0  
 25

<210> 1  
 <211> 1785  
 <212> ADN  
 30 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 35 <221> CDS  
 <222> (296)..(1291)

<400> 1  
 40

```

    agaaaggggt gcggcagcac tgccagggga agaggggat cgcacccggg gaaggtcgt 60
    gggcagggcg agttgggaaa gcggcagccc ccgccgcccc cgcagccct tctctcctt 120
    tctcccacgt cctatctgcc tctcgctgga ggccaggccg tgcagcatcg aagacaggag 180
    gaactggagc ctcatctgcc ggcccggggc gccggcctcg ggcttaaata ggagctccgg 240
    gctctggctg ggacccgacc gctgccggcc gcgctccgc tgctcctgcc ggggtg atg 298
                                     Met
                                     1
    50
    gaa aac ccc agc ccg gcc gcc gcc ctg ggc aag gcc ctc tgc gct ctc 346
    Glu Asn Pro Ser Pro Ala Ala Ala Leu Gly Lys Ala Leu Cys Ala Leu
                5                10                15
    55
    ctc ctg gcc act ctc ggc gcc gcc ggc cag cct ctt ggg gga gag tcc 394
    Leu Leu Ala Thr Leu Gly Ala Ala Gly Gln Pro Leu Gly Gly Glu Ser
                20                25                30
    60
    atc tgt tcc gcc gga gcc ccg gcc aaa tac agc atc acc ttc acg ggc 442
    Ile Cys Ser Ala Gly Ala Pro Ala Lys Tyr Ser Ile Thr Phe Thr Gly
                35                40                45
    65
  
```

# ES 2 331 106 T3

	aag tgg agc cag acg gcc ttc ccc aag cag tac ccc ctg ttc cgc ccc	490
	Lys Trp Ser Gln Thr Ala Phe Pro Lys Gln Tyr Pro Leu Phe Arg Pro	
	50 55 60 65	
5	cct gcg cag tgg tct tcg ctg ctg ggg gcc gcg cat agc tcc gac tac	538
	Pro Ala Gln Trp Ser Ser Leu Leu Gly Ala Ala His Ser Ser Asp Tyr	
	70 75 80	
10	agc atg tgg agg aag aac cag tac gtc agt aac ggg ctg cgc gac ttt	586
	Ser Met Trp Arg Lys Asn Gln Tyr Val Ser Asn Gly Leu Arg Asp Phe	
	85 90 95	
15	gcg gag cgc gcc gag gcc tgg gcg ctg atg aag gag atc gag gcg gcg	634
	Ala Glu Arg Gly Glu Ala Trp Ala Leu Met Lys Glu Ile Glu Ala Ala	
	100 105 110	
20	ggg gag gcg ctg cag agc gtg cac gcg gtg ttt tcg gcg ccc gcc gtc	682
	Gly Glu Ala Leu Gln Ser Val His Ala Val Phe Ser Ala Pro Ala Val	
	115 120 125	
25	ccc agc gcc acc ggg cag acg tcg gcg gag ctg gag gtg cag cgc agg	730
	Pro Ser Gly Thr Gly Gln Thr Ser Ala Glu Leu Glu Val Gln Arg Arg	
	130 135 140 145	
30	cac tcg ctg gtc tcg ttt gtg gtg cgc atc gtg ccc agc ccc gac tgg	778
	His Ser Leu Val Ser Phe Val Val Arg Ile Val Pro Ser Pro Asp Trp	
	150 155 160	
35	ttc gtg gcc gtg gac agc ctg gac ctg tgc gac ggg gac cgt tgg cgg	826
	Phe Val Gly Val Asp Ser Leu Asp Leu Cys Asp Gly Asp Arg Trp Arg	
	165 170 175	
40	gaa cag gcg gcg ctg gac ctg tac ccc tac gac gcc ggg acg gac agc	874
	Glu Gln Ala Ala Leu Asp Leu Tyr Pro Tyr Asp Ala Gly Thr Asp Ser	
	180 185 190	
45	ggc ttc acc ttc tcc tcc ccc aac ttc gcc acc atc ccg cag gac acg	922
	Gly Phe Thr Phe Ser Ser Pro Asn Phe Ala Thr Ile Pro Gln Asp Thr	
	195 200 205	
50	gtg acc gag ata acg tcc tcc tct ccc agc cac ccg gcc aac tcc ttc	970
	Val Thr Glu Ile Thr Ser Ser Ser Pro Ser His Pro Ala Asn Ser Phe	
	210 215 220 225	
55	tac tac cca cgg ctg aag gcc ctg cct ccc atc gcc agg gtg aca ctg	1018
	Tyr Tyr Pro Arg Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ile Ala Arg Val Thr Leu	
	230 235 240	
60	gtg cgg ctg cga cag agc ccc agg gcc ttc atc cct ccc gcc cca gtc	1066
	Val Arg Leu Arg Gln Ser Pro Arg Ala Phe Ile Pro Pro Ala Pro Val	
	245 250 255	
65	ctg ccc agc agg gac aat gag att gta gac agc gcc tca gtt cca gaa	1114
	Leu Pro Ser Arg Asp Asn Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Val Pro Glu	
	260 265 270	
	acg ccg ctg gac tgc gag gtc tcc ctg tgg tcg tcc tgg gga ctg tgc	1162
	Thr Pro Leu Asp Cys Glu Val Ser Leu Trp Ser Ser Trp Gly Leu Cys	
	275 280 285	
	gga gcc cac tgt ggg agg ctc ggg acc aag agc agg act cgc tac gtc	1210
	Gly Gly His Cys Gly Arg Leu Gly Thr Lys Ser Arg Thr Arg Tyr Val	
	290 295 300 305	
	cgg gtc cag ccc gcc aac aac ggg agc ccc tgc ccc gag ctc gaa gaa	1258
	Arg Val Gln Pro Ala Asn Asn Gly Ser Pro Cys Pro Glu Leu Glu Glu	
	310 315 320	
	gag gct gag tgc gtc cct gat aac tgc gtc taa gaccagagcc ccgcagcccc	1311
	Glu Ala Glu Cys Val Pro Asp Asn Cys Val	
	325 330	

# ES 2 331 106 T3

tggggccccc cggagccatg ggggtgtcggg ggctcctgtg caggctcatg ctgcaggcgg 1371  
 ccgagggcac aggggggttc gcgctgtctc tgaccgcggt gaggccgcgc cgaccatctc 1431  
 tgcactgaag ggccctctgg tggccggcac gggcattggg aaacagcctc ctcctttccc 1491  
 aaccttgctt cttaggggcc cccgtgtccc gtctgtcttc agcctcctcc tcttcagga 1551  
 taaagtcac cccaaggctc cagctactct aaattatgtc tccttataag ttattgctgc 1611  
 tccaggagat tgtccttcat cgtccagggg cctggctccc acgtggttgc agatacctca 1671  
 gacctggtgc tctaggtgt gctgagcca ctctccgag ggcgcacca agcgggggcc 1731  
 acttgagaag tgaataaatg gggcggttc ggaagcgtca aaaaaaaaaa aaaa 1785

<210> 2

<211> 331

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

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

# ES 2 331 106 T3

Phe Tyr Tyr Pro Arg Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ile Ala Arg Val Thr  
 225 230 235 240  
 Leu Val Arg Leu Arg Gln Ser Pro Arg Ala Phe Ile Pro Pro Ala Pro  
 245 250 255  
 Val Leu Pro Ser Arg Asp Asn Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Val Pro  
 260 265 270  
 Glu Thr Pro Leu Asp Cys Glu Val Ser Leu Trp Ser Ser Trp Gly Leu  
 275 280 285  
 Cys Gly Gly His Cys Gly Arg Leu Gly Thr Lys Ser Arg Thr Arg Tyr  
 290 295 300  
 Val Arg Val Gln Pro Ala Asn Asn Gly Ser Pro Cys Pro Glu Leu Glu  
 305 310 315 320  
 Glu Glu Ala Glu Cys Val Pro Asp Asn Cys Val  
 325 330

20 <210> 3  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador  
 30 <400> 3

cgcgcatagc tccgactac

19

35 <210> 4  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 40 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador  
 45 <400> 4

gccgcgtccg caaag

15

50 <210> 5  
 <211> 30  
 55 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 60 <223> Descripción de la secuencia artificial: sonda  
 <400> 5

aggaagaacc agtacgtcag taacgggctg

30

## ES 2 331 106 T3

<210> 6  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador  
 10  
 <400> 6  
  
 15 tccctctaga gccacatgg aaaaccccag cccggc 36  
  
 <210> 7  
 <211> 35  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 25 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador  
  
 <400> 7  
  
 30 aaggcatcac gtgtagacg cagttatcag ggacg 35  
  
 <210> 8  
 <211> 19  
 35 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 40 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido  
  
 <400> 8  
 45 **Pro Leu Gly Gly Glu Ser Ile Cys Ser Ala Gly Ala Pro Ala Lys Tyr**  
           1                  5                  10                  15  
       **Ser Ile Thr**  
 50  
 <210> 9  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 55 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido2  
 60  
 <400> 9  
  
 65 **Thr Phe Thr Gly Lys Trp Ser Gln Thr Ala Phe Pro Lys Gln Tyr Pro**  
           1                  5                  10                  15  
       **Leu Phe Arg**

ES 2 331 106 T3

<210> 10  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido  
 10  
 <400> 10  
  
 His Ser Ser Asp Tyr Ser Met Trp Arg Lys Asn Gln Tyr Val Ser  
 15 1 5 10 15  
  
 <210> 11  
 <211> 23  
 20 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 25 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido  
 <400> 11  
 30  
 Asp Ala Gly Thr Asp Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Pro Asn Phe Ala  
 1 5 10 15  
 Thr Ile Pro Gly Asp Thr Val  
 20  
 35  
 <210> 12  
 <211> 12  
 40 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 45 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido  
 <400> 12  
 50  
 Asn Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Val Pro Glu Thr  
 1 5 10  
 55  
 60  
 65