



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 242 460**

⑫ Número de solicitud: 200200900

⑬ Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C07K 14/82 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **08.04.2002**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **01.11.2005**

Fecha de la concesión: **06.02.2007**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **01.03.2007**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.03.2007

⑲ Titular/es: **Fontlab 2000 S.L.**
Polígono Industrial Can Magre
c/ Carles Buigas, nau 76
08187 Santa Eulalia de Roncana, Barcelona, ES

⑳ Inventor/es: **Guil Domènech, Sònia;**
Fernández Larrea, Juan y
Bach Elías, Montse

㉑ Agente: **No consta**

㉒ Título: **Ácido nucleico que codifica una proteína p19 H-Ras de mamífero y su exón IDX, péptidos y proteínas codificados por dicho ácido nucleico, y sus aplicaciones.**

㉓ Resumen:

Ácido nucleico que codifica una proteína p19 H-Ras de mamífero y su exón IDX, péptidos y proteínas codificados por dicho ácido nucleico, y sus aplicaciones.

La invención está relacionada con la detección del cáncer y su tratamiento. Se describe una nueva proteína llamada "p19 H-Ras" cuyo gen está implicado en la regulación del ciclo celular de las células eucariotas. La proteína p19 H-Ras está codificada por un ácido nucleico derivado del gen H-ras. Esta nueva proteína es la segunda que es codificada por el mismo gen y esto es debido a que existe un procesamiento alternativo de exones en el ácido nucleico llamado pre-ARNm (pre-ARN mensajero). Este procesamiento alternativo del pre-ARNm también es conocido como "splicing" alternativo.

ES 2 242 460 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Ácido nucleico que codifica una proteína p19 H-Ras de mamífero y su exón IDX, péptidos y proteínas codificados por dicho ácido nucleico, y sus aplicaciones.

Campo de la invención

La invención está relacionada con la detección del cáncer y su tratamiento. Se describe una nueva proteína llamada "p19 H-Ras" cuyo gen está implicado en la regulación del ciclo celular de las células eucariotas. La proteína p19 H-Ras está codificada por un ácido nucleico derivado del gen H-*ras*. Esta nueva proteína es la segunda que es codificada por el mismo gen y esto es debido a que existe un procesamiento alternativo de exones en el ácido nucleico llamado pre-ARNm (pre-ARN mensajero). Este procesamiento alternativo del pre-ARNm también es conocido como "splicing" alternativo.

Antecedentes de la invención

Las células de mamíferos contienen los genes funcionales c-*ras*: c-H-Ras, c-K-Ras y c-N-Ras, que en los últimos 20 años han generado un importante conocimiento tanto sobre la transducción de señal tanto normal como tumoral, revisado por (Barbacid, 1987; Malumbres and Pellicer, 1998; Reuther and Der, 2000). Las proteínas Ras son GTPasas que también unen los nucleótidos GDP y GTP. El cambio de las proteínas Ras entre el estado inactivo, proteína unida a GDP, y el estado activo, proteína unida a GTP, en combinación con la unión a proteínas diana, es la llave para la transducción de la señal celular. Las señales celulares son transmitidas por una cascada de modificaciones bioquímicas de factores proteicos que regulan varios vías fisiológicas que acaban afectando el ciclo celular, y provocando, según la naturaleza del estímulo externo, tanto proliferación como diferenciación o apoptosis de células normales, revisado en (Barbacid, 1987; Malumbres and Pellicer, 1998; Reuther and Der, 2000). Ras activado se ha detectado en un 30% de los tumores humanos testados y está frecuentemente mutado en animales modelos experimentales, siendo los genes más frecuentemente activados en cáncer, revisado por (Barbacid, 1987; Malumbres and Pellicer, 1998).

Dos K-Ras ARNms se obtienen a partir del mismo pre-ARNm por splicing alternativo de los últimos exones codificantes 4A y 4B, que se traducen a las proteínas p21 K-Ras4A y p21 K-Ras4B, respectivamente. Las proteínas p21 H-Ras, N-Ras, K-Ras4A y K-Ras4B presentan 100% de identidad en los aminoácidos 20-48 (los cuales son importantes para la interacción con los efectores) y una identidad total de secuencia de alrededor del 85%, ver revisión (Barbacid, 1987; Malumbres and Pellicer, 1998; Reuther and Der, 2000). La región más divergente entre estas cuatro proteínas es la zona hipervariable o carboxilo-terminal. Catorce aminoácidos en la zona carboxilo-terminal de las proteínas Ras contienen todos los elementos necesarios para su localización en la membrana plasmática: H-Ras, ESGPGCMSCKCVLS; N-Ras, DGTQGCMGLPCVVM; K-Ras4A, KTPGCVKIKKCIIM y K-Ras4B, KKKKKSKTKCVIM (Apolloni *et al.*, 2000; Choy *et al.*, 1999) (el motivo CAAX y la cisteína interna palmitoliada están subrayadas). Estos catorce aminoácidos dirigen tres modificaciones post-traduccionales: farnesilación de la cisteína 186 en el motivo CAAX; proteólisis de AAX y carboximetilación de la cisteína 186 (Dai *et al.*, 1998; Romano *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 1998). Estas modificaciones dan a lugar a cuatro proteínas más hidrofóbicas con más afinidad por membranas.

No está nada claro si estas cuatro proteínas tienen una función redundante o diferente, pero evidencias recientes indican que ellas pueden tener diferentes funciones fisiológicas. Experimentos de desactivación de los genes *ras* (knock-out) indican que H-*ras*, pero no H-*ras* o N-*ras*, es esencial para el desarrollo del ratón (Esteban *et al.*, 2001; Ise *et al.*, 2000; Johnson *et al.*, 1997; Koera *et al.*, 1997; Umanoff *et al.*, 1995), pero esto no excluye que H-*ras* y N-*ras* tengan un papel importante en la célula. Las proteínas Ras también difieren en su microlocalización en la membrana plasmática, transito dentro de la células e interacción con los proteínas efectoras de Ras, revisado en (Barbacid, 1987; Malumbres and Pellicer, 1998; Reuther and Der, 2000). La estructura de las caveolas es esencial para la activación de Raf1 por H-Ras pero no es esencial cuando esta activación es realizada por K-Ras4B, lo cual sugiere que K-Ras4B está asociado a un microdominio diferente de la membrana plasmática (Barbacid, 1987; Malumbres and Pellicer, 1998; Reuther and Der, 2000). K-Ras4B parece activar mejor Raf1 que H-Ras; H-Ras activa mejor fosfoinositol 3-quinasa que K-Ras4B, revisado por (Barbacid, 1987; Malumbres and Pellicer, 1998; Reuther and Der, 2000).

En 1989 Cohen *et al.* sugirió que la familia Ras podría ser más extensa. Estos autores publicaron que el pre-mRNA de H-Ras tenía un splicing alternativo en el penúltimo 3' exon codificante (Cohen *et al.*, 1989). El gen c-H-Ras puede dar lugar a dos mRNAs, uno con un codón de stop en el exón 4A (E4A) y un segundo mensaje con un codón de stop en el exon llamado IDX (ver figura 1). El mensaje E0-E1-E2-E3-E4A-E4B codifica la conocida p21 H-Ras4A y el mensaje E0-E1-E2-E3-IDX-E4A-E4B codifica para una proteína hipotética llamada p19 H-RasIDX (que aquí llamaremos p 19 H-Ras). Estos autores sugirieron que el ARNm era inestable, muy difícil de detectar y que posiblemente la proteína p19 H-Ras no sería obtenida (Cohen *et al.*, 1989). Estos mismos autores sugirieron que el producto de este splicing alternativo, el ARNm de la p19 H-Ras (o la proteína hipotética que codifica), no tenía potencial transformante; ellos también sugirieron que la actividad transformante del gen H-*ras* es inversamente proporcional a la eficiencia del splicing alternativo del pre-ARNm de H-*ras* hacia en ARNm de la p19 H-Ras (Cohen *et al.*, 1989). Más tarde, Huang y Cohen sugirieron que si la hipotética proteína p 19 H-Ras existiera esta podría tener propiedades para ser un regulador negativo de la proteína p21 H-Ras (Huang and Cohen, 1997). Hasta ahora no se sabía si la proteína p19 H-Ras existía.

Aquí demostramos que el ARNm de la proteína p19 H-Ras es estable y que la proteína existe.

Compendio de la invención

Se descubre que el ARNm de la p19 H-Ras es estable y se descubre que la proteína existe y es fácilmente detectable con un anticuerpo específico. Para ello se presenta un ensayo Northern blot en el que una matriz de puntos conteniendo ARN mensajero de diferentes tejidos es hibridado con una sonda específica que reconoce sólo el mensajero de la p19 H-Ras. La figura 2 demuestra que este mensajero es diferencialmente expresado y es estable en diferentes tejidos humanos y líneas celulares. El segundo experimento es hacer un anticuerpo contra los 20 aminoácidos - o bien contra un zona de estos 20 aminoácidos - los cuales son específicos de la zona carboxilo-terminal de una proteína p19 H-Ras, y ensayar mediante la técnica de Western blot, la figura 3 enseña cómo se detecta sin dificultad esta proteína con los anticuerpos específicos. La figura 4 enseña la secuencia de ácido nucleico cuyo uso reivindicamos en esta patente, y se presenta de diferentes mamíferos. La figura 5 enseña la secuencia de 20 aminoácidos específica de la zona carboxilo-terminal de una proteína p19 H-Ras, secuencia peptídica cuyo uso reivindicamos en esta patente, y se presenta esta secuencia de diferentes mamíferos. La figura 6 es la secuencia codificante de aminoácidos de una proteína p19 H-Ras humana cuyo uso reivindicamos en esta patente. También reivindicamos el uso de unas proteínas p19 H-Ras homólogas de otros mamíferos.

El pre-mRNA del gen H-ras puede dar a lugar a dos mensajes de ARN mensajero finales, que se traducirán a dos proteínas parcialmente distintas. Esto es debido a que existe dos secuencias de ácido nucleico, llamadas exones, dentro del pre-ARNm. El mensaje final de la p19 H-Ras contiene el exón IDX como exón 3' terminal codificante, mientras que la ya conocida proteína p21 H-Ras contiene el exón E4A como exón 3' terminal codificante y no contiene el exón IDX dentro de su mensaje (ver Figura 1). Nadie había detectado la proteína p19 H-Ras antes que los inventores de este documento.

Se reivindica el uso de una proteína p19 H-Ras humana y de otros mamíferos. Esta invención también reivindica lo siguiente: una molécula de ácido nucleico que híbrida con un exón IDX humano y de otros mamíferos. El exón IDX es un ácido nucleico formado por una secuencia que codifica veinte aminoácidos diferenciales de una proteína p19 H-Ras; anticuerpos que se unan a los 20 aminoácidos carboxi-terminales de una proteína p19 H-Ras; anticuerpos contra polipéptidos derivados de los 20 aminoácidos carboxi-terminales de una proteína p19 H-Ras; métodos para detectar ácidos nucleicos que codifican específicamente una proteína p19 H-Ras, o sea un ácido nucleico que contenga una secuencia IDX humana o de otros mamíferos; métodos para detectar ácidos nucleicos alterados o mutados que codifican específicamente una proteína p19 H-Ras, o sea un ácido nucleico alterado o mutado que contenga una secuencia IDX humana o de otros mamíferos; métodos para producir una proteína p19 H-Ras usando el ácido nucleico que contiene una secuencia IDX, la cual codifica para el carboxi-terminal de una proteína p19 H-Ras; una proteína p19 H-Ras obtenida por medios recombinantes; una proteína p19 H-Ras recombinante purificada fusionada que esté derivada de la fusión de la secuencia polipeptídica de una proteína p19 H-Ras con una segunda secuencia polipeptídica; métodos para tratar el cáncer que empleen una proteína p19 H-Ras recombinante purificada; métodos para tratar el cáncer que empleen la proteína p19 H-Ras recombinante purificada fusionada a otras proteínas; métodos que induzcan la parada del ciclo celular empleando una proteína p19 H-Ras o el ácido nucleico IDX que codifica el carboxilo-terminal de una proteína p19 H-Ras; métodos para detectar una proteína p19 H-Ras empleando anticuerpos que reconozcan los 20 aminoácidos carboxilo-terminales de una proteína p19 H-Ras; métodos que selectivamente vayan dirigidos a matar células que tengan un crecimiento descontrolado empleando anticuerpos que reconozcan los 20 aminoácidos carboxilo-terminales de una proteína p19 H-Ras, o conjugados derivados de estos anticuerpos o fragmentos derivados de estos anticuerpos; métodos que estimulen el crecimiento celular empleando 20 aminoácidos carboxilo-terminales de una proteína p19 H-Ras, o conjugados derivados de estos anticuerpos o fragmentos derivados de estos anticuerpos; mamíferos no-humanos transgénicos que tengan una proteína p19 H-Ras alterada por ingeniería genética en uno o varios nucleótidos del ácido nucleico IDX; mamíferos no-humanos transgénicos que contengan una o más copias del ácido nucleico que codifica para una proteína p 19 H-Ras humana o de otros mamíferos en forma salvaje o mutante, en adición del gen H-ras natural estando el gen H-ras natural en forma salvaje o bien modificado (mutado); mamíferos no-humanos transgénicos que han sido modificados para sobre-expresar una proteína p19 H-Ras humana o de otros mamíferos, estando esta en forma salvaje o mutada.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Splicing alternativo del gen H-ras. Los codones de stop están remarcados en la figura.

Figura 2. El ARNm de la p19 H-Ras es estable y se expresa diferencialmente en varios tejidos humanos y líneas celulares.

Ensayo mediante Northern blot sobre una matriz de puntos conteniendo ARN poliadenilado obtenido de diferentes tejidos (MTE). El Northern blot fue incubado con una ribosonda anti-IDX marcada radioactivamente. La mayor intensidad del punto radioactivo refleja mayor expresión del ARNm de la p19 H-Ras. Tejidos: 1A, cerebro total; 1B, corteza cerebral; 1C, lóbulo frontal; 1D, lóbulo parietal; 1E, lóbulo occipital; 1F, lóbulo temporal; 1G, p.g. de la corteza cerebral; 1H, puentes de Varolio; 2A, cerebelo izquierdo; 2B, cerebelo derecho; 2C, cuerpo *callosum*; 2D, amígdala; 2E, Núcleo del caudato; 2F, hipocampo; 2G, oblongata de la médula; 2H, púrpura; 3B, núcleo de accumbens; 3C, tálamo; 4A, corazón; 4B, aorta; 4C, atrio izquierdo; 4D, atrio derecho; 4E, ventrículo izquierdo; 4F, ventrículo derecho; 4G, tabique intraventricular; 4H, ápice del corazón; 5A, esófago; 5B, estómago; 5C, duodeno; 5D, *jejunum*; 5E,

ileum; 5F, *ileocecum*; 5G, apéndice; 5H, colón ascendente; 6A, colón transversal; 6B, colón descendente; 6C, recto; 7A, riñón; 7B, músculo esquelético; 7C, bazo; 7D, timo; 7E, leucocito periférico de sangre; 7F, nódulo de la linfa; 7G, médula; 7H, tráquea; 8A, pulmón; 8B, placenta; 8C, vejiga; 8D, útero; 8E, próstata; 8F, testículos; 8G, ovario; 9A, hígado; 9B, páncreas; 9C, glándula suprarrenal; 9D, glándula de tiroides; 9E, glándula salivar; 10A, células HL-60; 10B, células HeLa S3; 10C, células K-562; 10D, células MOLT-4; 10E, células Raji; 10F, células Daudi; 10G, células SW480; 10H, células A549; 11A, cerebro fetal; 11B, corazón fetal; 11C, riñón fetal; 11D, hígado fetal; 11E, bazo fetal; 11F, timo fetal; 11G, pulmón fetal; 12A, ARN total de levadura; 12B, total ARNt de levadura; 12C, ARN ribosomal de bacteria; 12D, ADN de bacteria; 12E, polirribosomal; 12F, ADN humano Cot-1; 12G, ADN humano 100 ng y 12H, ADN humano 500 ng.

Figura 3. Detección por ensayos de Western Bloc de la proteína p19 H-Ras endógena en extractos proteicos nucleares de la especie humana.

Ensayo hecho con el anticuerpo SP1 descrito en materiales y métodos. Carriles 3 y 6 contienen proteínas de un extracto nuclear de células humanas HeLa, hecho por extracción con SDS e incubado con el suero pre-inmune del conejo (control negativo) y con el suero SP1, respectivamente; carriles 2 y 5 contienen proteínas de un extracto total bacteriano que expresa la proteína de fusión recombinante GST-p19 H-Ras e incubado con el suero pre-inmune del conejo (control negativo) y con el suero SP1, respectivamente y carriles 1 y 4 contienen proteínas de un extracto total bacteriano que expresa la proteína de fusión recombinante GST-p21 H-Ras4A e incubado con el suero pre-inmune del conejo (control negativo) y con el suero SP1, respectivamente.

Figura 4. Secuencias de ácidos nucleicos que definen el exon IDX en diferentes mamíferos. Se reivindica su uso.

Conservación del exón IDX en los mamíferos. La figura enseña diferentes secuencias del exón IDX de diferentes mamíferos. La secuencia más conservada se enseña debajo (consensos). Las secuencias que estaban en el banco genómico son las siguientes: humana (*Homo sapiens*, número de acceso BC006499.1) (SEQ ID NO: 1); hámster (*Mesocricetus auratus*, número de acceso M84166.1) (SEQ ID NO: 6) y ratón (*Mus musculus*, AF081118) (SEQ ID NO: 8); secuencias obtenidas por los inventores de esta patente mediante secuenciación directa de ARNm de las siguientes mamíferos: mono (células en cultivo COS-1, *Cercopithecus aethiops*) (SEQ ID NO: 2); buey (*Bos Taurus*) (SEQ ID NO: 3); cerdo (*Sus scrofa*) (SEQ ID NO: 4); conejo (*Oryctolagus cuniculus*) (SEQ ID NO: 5) y rata (células en cultivo Rat-1, *Rattus norvegicus*) (SEQ ID NO: 7).

Figura 5. Secuencias peptídicas que son obtenidas de la traducción del exón IDX de diferentes especies: humana (SEQ ID NO: 9), mono (SEQ ID NO: 10), buey (SEQ ID NO: 11), cerdo (SEQ ID NO: 12), conejo (SEQ ID NO: 13), hámster (SEQ ID NO: 14), rata (SEQ ID NO: 15) y ratón (SEQ ID NO: 16). Se reivindica el uso de esta secuencia.

Se obtuvieron de la traducción de la secuencia de ácido nucleico que se presenta en la figura 4. Se presentan los aminoácidos más conservados (consensos).

Figura 6. Secuencia de amino ácidos de la proteína p19 H-Ras humana (SEQ ID NO: 17).

Se reivindica el uso de esta secuencia completa, y de secuencias mutantes o modificadas de los 20 aminoácidos carboxilo-terminales de la proteína p19 H-Ras.

Descripción detallada de la invención

Definiciones y ejemplos

Vectores

Esta invención se refiere a vectores como los plásmidos que comprenden una molécula de ácido nucleico (ADN) que codifica la p19 H-Ras, adaptada para la expresión en bacteria, levaduras o células de mamíferos la cual contiene además los elementos reguladores necesarios para la expresión del ácido nucleico en bacteria, levaduras o células de mamíferos de tal manera localizadas respecto al ácido nucleico que codifica la p19 H-Ras para así permitir su expresión. Ejemplos de vectores son los bacteriófagos (como el fago lambda), cósmidos, plásmidos (como pUC 18, que se puede obtener de Pharmacia, Piscataway, NJ), y otros vectores recombinantes. Existen muchos vectores distintos para bacteria, levaduras y mamíferos. Un ejemplo de vector de levaduras pGADT7 (Clontech) y un ejemplo de vector de mamíferos es pcDNA3 (Invitrogen). Las moléculas de ácido nucleico se insertan en los genomas de los vectores por métodos bien conocidos por personas que normalmente los usan o vayan a usarlos. Un ejemplo de estos plásmidos que contienen el ácido nucleico IDX es la Ribosonda Anti-IDX para el ensayo de Northern sobre ARNs de múltiples tejidos (MTE, figura 2), y los otros vectores descritos en construcción de vectores en materiales y métodos. De manera alternativa, para obtener estos vectores, el inserto y vector de ácido nucleicos pueden ser ambos expuestos a enzimas de restricción para crear terminales complementarios en ambas moléculas los cuales se aparean unos terminales con otros (el terminal del inserto con el terminal del vector) y después son ligados con una ligasa. Alternativamente, moléculas de ácido nucleico puente pueden ser ligadas al ácido nucleico inserto las cuáles corresponden a un sitio de restricción del vector ácido nucleico, ambas moléculas son digeridas con el enzima de restricción que corta este sitio presente en el puente y en el vector. Existen otras maneras de crear vectores con el inserto.

Sonda

Sonda es una prueba de ácido nucleico que comprende un ácido nucleico de al menos 13 nucleótidos que tenga capacidad de hibridar específicamente con cualquier región de las secuencias enseñadas en la figura 4. La frase “hibridar específicamente” significa la habilidad que tiene una molécula de ácido nucleico de reconocer la secuencia de ácido nucleico complementaria a si misma y formar segmentos de doble hélice mediante puentes de hidrógeno entre las bases complementarias. La tecnología para hacer sondas de ácido nucleico es bien conocida por personas que la usan, las cuales van a apreciar que estas sondas pueden variar enormemente en longitud y también pueden ser marcadas con un marcador detectable, como un radioisótopo o un marcador fluorescente, para facilitar la detección de la sonda. La detección del nivel del ácido nucleico que codifica la p19 H-Ras es útil como un test diagnóstico para cualquier proceso de enfermedad en el cual los niveles de expresión de la correspondiente proteína p19 H-Ras están alterados. Las sondas de ácido nucleico se consiguen por inserción de una molécula de ácido nucleico que codifica el ácido nucleico IDX ó fragmentos de IDX, de cualquiera de las especies arriba mencionadas, en un vector adecuado, como plásmidos o bacteriófagos, seguido de la inserción en una célula bacteriana adecuada y replicación y recuperación de la prueba de ácido nucleico, empleando en el proceso métodos muy bien conocidos en esta tecnología. Por ejemplo, el ácido nucleico puede ser extraído a partir de un lisado celular con fenol y etanol, digerido con enzimas de restricción correspondientes a los sitios de inserto del ácido nucleico sonda dentro del vector (discutido en materiales y métodos), separado por electroforesis y cortado del gel. Otra manera es transcribir el ARN complementario a partir del vector purificado para hacer Northernblots con ribosonda. Este último proceso es muy bien conocido en esta tecnología. Un ejemplo de vector sonda es la ribosonda Anti-IDX para el ensayo de Northern sobre ARNs de múltiples tejidos (MTE, figura 2). La detección Northern es proceso muy bien conocido en esta tecnología. Un ejemplo se enseña arriba en materiales y métodos con el Northern exónico con la ribosonda anti-IDX (MTE, figura 2) y es aplicable a todas las especies mencionadas. Toda la tecnología es muy conocida y como bibliografía damos el manual: Maniatis, T. *Et al.* Molecular Cloning; Cold Spring Harbor Laboratory (1982).

Detección del gen

Como ejemplo de método de detección de la expresión del ARNm que codifica la proteína p19 H-Ras gen puede ser por Northern o por RT-PCR ambos descritos arriba en materiales y métodos. Toda la tecnología es muy conocida y como bibliografía damos el manual: Maniatis, T. *Et al.* Molecular Cloning; Cold Spring Harbor Laboratory (1982).

Método para obtener la proteína

El método para obtener la proteína p19 H-Ras recombinante es muy conocido y standard. Los vectores pueden tener secuencias marcadores como GST o cola de histidinas que permiten aislar la proteína. Como ejemplo presentamos en materiales y métodos el vector GST-p19 H-Ras obtenido tal como indica el proveedor del plásmido pGEX-4T-3 (Pharmacia). Reivindicamos la purificación de la proteína p19 H-Ras unida a cualquier marcador. Otro método de obtener una proteína p19 H-Ras comprende inducir las células a expresar más p19 H-Ras, recuperar la p19 H-Ras a partir de estas células y purificar la proteína p19 H-Ras de extracto recuperado. Un ejemplo de una proteína p19 H-Ras aislada de células es una proteína aislada (sea por sobreexpresión de la proteína mediante el uso de vectores o bien por inducción de la expresión endógena) que contenga la misma secuencia de aminoácidos descritas en la Figura 5. Como ejemplo, las células que expresan p19 H-Ras pueden ser homogeneizadas y la proteína p19 H-Ras puede ser purificada con una columna de inmunoafinidad confeccionada con un anticuerpo anti-p19 H-Ras. Otro ejemplo es a partir del homogenizado celular se hacen columnas de intercambio iónico y se determinan las fracciones que contienen p19 H-Ras empleando los anticuerpos anti-p19 H-Ras.

Anticuerpos anti-p19 H-Ras

Los anticuerpos específicos de la p19 H-Ras, tanto policlonales como monoclonales, son útiles para la detección del nivel de expresión de la proteína p19 H-Ras. La detección del nivel de la proteína p19 H-Ras es útil como un test diagnóstico para cualquier proceso de enfermedad en el cual los niveles de expresión de la correspondiente proteína p19 H-Ras están alterados. Los anticuerpos permiten también detectar la secuencia específica de la proteína p19 H-Ras en cualquier circunstancia y son por tanto un producto que puede volverse muy rápidamente comercial. Un ejemplo del uso de este anticuerpo se enseña en la Figura 3 mediante la técnica de Western blot que es una técnica muy conocida para los conocedores de esta tecnología.

Animales modificados

Esta invención reivindica un mamífero no humano transgénico que contenga el ácido nucleico IDX enseñadas en la Figura 4. También reivindica un mamífero no humano transgénico que contenga la secuencia de ácido nucleico IDX enseñadas en la Figura 4 mutadas de tal manera que la proteína p19 H-Ras es incapaz de ejercer su función o bien, por ejemplo, no se expresa la proteína p19 H-Ras nativa. Se reivindica también un mamífero no humano transgénico cuyo genoma contiene un ácido nucleico (ADN) que codifica la secuencia IDX, o fragmentos de ella, añadido de tal manera para ser transcrito como ácido nucleico anti-sentido (antisense-ARN) que será complementario a la secuencia de ácido nucleico IDX con la finalidad de reducir la traducción del ARNm a la proteína p19 H-Ras. El ácido nucleico (ADN) añadido puede adicionalmente contener un promotor inducible o contener elementos reguladores específicos de tejido, y así su expresión puede ser inducida o restringida a tipos celulares específicos. Ejemplos de moléculas de ácido nucleico ADN son ADN y ADN complementario que contienen la secuencia IDX son substancialmente las mismas

que se enseñan en la Figura 4. Un ejemplo de un animal transgénico es un ratón transgénico. Ejemplos de regiones que determinan especificidad de tejido es el promotor de la *metallothioneina* (Low, M.J., Lechan, R. M., Hammer, R.E. *et al.* Science 231: 1002-1004, 1986, y el promotor L7 (Oberdick, J., Smeyne, R.J., Mann, J.R., Jackson, S. Y Morgan, J.I. Science 248:223-226, 1990).

5 Sistemas de animales modelo que permiten elucidar el papel fisiológico y comportamiento de la proteína p19 H-Ras se consiguen mediante una variedad de técnicas creando animales transgénicos donde se incrementa o disminuye la expresión de la p19 H-Ras, o bien se alteran los aminoácidos codificados por el ácido nucleico IDX. Ejemplos de estas técnicas incluyen, pero no están limitadas a: 1) inserción de versiones normales o mutantes de ADN que codifica la proteína p19 H-Ras humana, o bien versiones de este gen homólogas de otros animales, por microinyección, infección retroviral (u otros medios bien conocidos por personas entrenadas en esta tecnología) en embriones fertilizados apropiados con la finalidad de obtener el animal transgénico (Hogan B *et al.* Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1986) o, 2) Recombinación homóloga (Capecchi M.R. Science 244: 1288-1292, 1989; Zimmer, A. And Gruss, P. Nature 338: 150-153, 1989), de versión mutante o normal, de versión humana o animal del gen que codifica la proteína p19 H-Ras, con el locus del gen nativo en animales transgénicos para alterar la regulación de la expresión o la estructura de la proteína p19 H-Ras. La técnica de recombinación homóloga es bien conocida por personas entrenadas en esta tecnología. Ella reemplaza el gen nativo con el gen insertado y así es útil para producir un animal que no puede expresar la proteína p19 H-Ras nativa pero si expresa, por ejemplo una proteína p19 H-Ras humana mutada, la cual ha reemplazado la proteína p19 H-Ras nativa en el genoma animal por recombinación homóloga, resultado en la disminución de la expresión de la proteína p19 H-Ras. Microinyección adicional genes al genoma, pero no los reemplaza, y así es útil para producir animales que expresan por sí mismos p19 H-Ras añadida, resultado en la sobreexpresión de la proteína p19 H-Ras.

25 Una manera accesible para producir animales transgénicos, con el ratón como ejemplo, es la siguiente: Ratones hembra son apareadas, y los huevos fertilizados resultantes son obtenidos de sus oviductos. Los huevos se conservan en un medio apropiado como el medio M2 (Bogan B *et al.* Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1986). ADN o ADN complementario que codifica el gen de la proteína p19 H-Ras se purifica de un vector (como el GST-p19 H-Ras descrito arriba) métodos bien conocidos en este tipo de tecnología. Promotores inducibles pueden ser fusionados con la región codificante del ADN para permitir un medio experimental para regular la expresión del trans-gen. El ADN, diluido en una solución tampón apropiada, se introduce dentro de una aguja de microinyección (la cual se puede hacer a partir de un tubo capilar) y el huevo a ser inyectado se pone en un slide cóncavo. La aguja se inserta en el pronúcleo del huevo, y la solución de DNA es inyectada. El huevo inyectado es transferido dentro de un oviducto de un ratón pseudoembarazada (un ratón estimulado por hormonas apropiadas para mantener un pseudoembarazo pero no estando realmente embarazada), donde se dirige hacia el útero, se implanta, y se desarrolla hasta el término del embarazo. Como se ha descrito arriba, la microinyección no es el único método para insertar ADN dentro de un huevo, y la usamos aquí con el propósito de dar un ejemplo.

40 Estos sistemas de animales modelo son útiles para predecir o evaluar posibles aplicaciones terapéuticas de drogas que activan o inhiben la función de la p19 H-Ras mediante la inducción o inhibición de la expresión del gen nativo o del trans-gen y así incrementando o disminuyendo la expresión de la proteína p19 H-Ras tanto normal como mutada en animales vivos. Así pues, un sistema animal modelo se produce para evaluar drogas antes incluso de que estas drogas sean accesibles. Un animal transgénico que sobre- o infraexpresa a proteína p19 H-Ras indica por su estado fisiológico si la sobre o infraproducción es terapéuticamente útil. Es pues útil evaluar la acción de una droga basada en un sistema transgénico modelo.

45 Materiales y métodos

Cultivo celular, preparación del ARNm y preparación de extractos proteicos totales

50 Células HeLa, Rat-1, COS-1 se propagaron en medio DMEM complementado con un método similar al descrito previamente (de la Iglesia *et al.*, 1999). ARN total de cada línea celular fue obtenido por extracción con tiocianato de guanidinio y ultracentrifugación en un cojín de cloruro de cesio con un método similar al descrito previamente (Glisin *et al.*, 1974). Extractos proteicos nucleares fueron preparados con un método similar al descrito previamente (Dignam *et al.*, 1983). Los extractos en dodecil sulfato sódico (SDS) se obtuvieron en tampón de muestras proteico con un método similar al descrito previamente (Cleveland *et al.*, 1977). Origen del ARN total que se ha obtenido de diferentes mamíferos: COS-1, es una célula de mono establecida para cultivo celular; Rat-1 es una célula de rata establecida para cultivo celular; los demás provenían de hígado de cerdo, conejo y buey.

Anticuerpos y ensayos por Western blots

60 Anticuerpos que reconocen específicamente la proteína p19 H-Ras fueron obtenidos a partir de inmunizaciones de conejos empleando el péptido humano GSRSGSSSSSGTLWD (SEQ ID NO: 18) que corresponde a los 15 primeros aminoácidos de la zona carboxilo-terminal de la p19 H-Ras (ver figura 5). Este péptido se sintetizó con una cisteína adicional en la zona carboxilo-terminal para su posterior conjugación a hemocianina de molusco (KLH) con un método similar al descrito previamente (Babia *et al.*, 1999). Suero pre-inmune (control negativo) fue obtenido de los conejos antes de iniciar la inmunización. El suero fue testado en ensayos de Western blot, cuyos blots contenían extracto total bacteriano (*Escherichia coli*, cepa BL21), de dos cepas que expresan, respectivamente, las proteínas recombinantes GST-p19 H-Ras y GST-p21 H-Ras. Estos extractos bacterianos han sido obtenidos con un método similar a uno

previamente descrito (Kaelin *et al.*, 1992). Un suero con buena especificidad fue obtenido (enseñado en la figura 3) y fue nombrado SP1; este suero también fue ensayado en ELISAs de competición con ELISAs conteniendo el péptido inicial con un método similar a uno previamente descrito (Babia *et al.*, 1999).

5 Construcción de vectores

Todos los insertos de plásmidos fueron obtenidos por PCR empleando una ADN polimerasa *Pfu*, con la excepción de la ribosonda antisentido (anti-IDX) que fue amplificada con una *Taq* ADN polimerasa. Todos los plásmidos fueron comprobados por secuenciación de ADN. La ribosonda Anti-IDX para el ensayo de Northern sobre ARNs de múltiples tejidos (MTE, figura 2) fue obtenida con los cebadores IDXfor (SEQ ID NO: 22) y IDXrev (SEQ ID NO: 24) y RT-PCR sobre ARNm humano. La ribosonda antisentido anti-IDX fue transcrita con la ARN polimerasa T3 después que se linealizó el plásmido con *NotI*. Vector de expresión GST-p19 H-Ras: el fragmento que codifica el ácido nucleico ARNm de la proteína p19 H-Ras fue amplificado a partir de RNA total de células humanas HeLa empleando el método PCR y los cebadores E1 for (SEQ ID NO: 25) y IDX-GSTrev (SEQ ID NO: 26). El producto de PCR fue digerido con BamHI y EcoRI y clonado en los mismos sitios del vector pGEX-4T-3. Vector de expresión GST-p21 H-Ras4A: fue obtenido como el vector de expresión GST-p19 H-Ras pero empleando los cebadores p21-GSTrev (SEQ ID NO: 27) en lugar de IDX-GSTrev (SEQ ID NO: 26).

RT-PCR y oligodesoxinucleótidos

Las reacciones de RT-PCR fueron hechas con un método similar al descrito previamente (Codony *et al.*, 2001). Todas las bandas obtenidas por PCR fueron secuenciadas mediante técnicas standard de secuenciación del ADN. Las secuencias nuevas de IDX de otros mamíferos fueron obtenidas por RT-PCR del RNA total empleando oligodT para la reacción de RT, y *Pfu* ADN polimerasa para la PCR, en tres experimentos independientes.

25 Oligodesoxinucleótidos empleados

E3for: SEQ ID NO: 19; E4Arev: SEQ ID NO: 20; ratE4rev: SEQ ID NO: 21; IDXfor: SEQ ID NO: 22; D2/848: SEQ ID NO: 23; IDXrev: SEQ ID NO: 24; E 1 for: SEQ ID NO: 25; IDX-GSTrev: SEQ ID NO: 26; p21-GSTrev: SEQ ID NO: 27; GFP-p19 dir: SEQ ID NO: 28.

Northern exónico en una matriz de puntos que contiene poli A+ de diferentes tejidos humanos (MTE array)

Ensayos Northern exónicos en puntos fueron hechos con un método similar al descrito (Porchet and Aubert, 2000). El array MTE fue comprado a la empresa Clontech (número de catálogo 7775-1) y fue ensayado con la ribosonda anti-IDX (antisense). Esta membrana de Nylon contenía una carga normalizada de ARN poli A+ de 72 tejidos humanos diferentes y ocho ARNs o ADNs controles. La normalización había sido hecha por la empresa Clontech antes de vender el papel de Nylon MTE. Esta normalización tiene en cuenta las diferencias de los niveles de transcripción, y la empresa Clontech normaliza la carga de poli A+ respecto a ocho genes "housekeeping" que son genes de naturaleza constitutiva y se expresan en la mayoría de las células, β -actina; gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa; ubiquitina; proteína de 23 kDa altamente básica; α -tubulina; fosfolipasa A2; proteína ribosomal S9; receptor de la transferrina y hipoxantina guanina fosforribosil transferasa) porque estos ARNs presentan una variación en todos los puntos ensayados en el MTE array y también pertenecen a clases funcionales diferentes. Así pues la intensidad obtenida en los puntos indicarán la abundancia relativa del ARNm de la p19 H-Ras presente en diferentes tejidos.

45 Bibliografía

- Apolloni, A., Prior, I. A., Lindsay, M., Parton, R. G., and Hancock, J. F. (2000). H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway. *Mol Cell Biol* 20, 2475-2487.
- Bahia, D., Font, J., Khaouja, A., Carreras, N., Espuny, R., Cicarelli, R. M. B., Ingelmo, M., and BachElias, M. (1999). Antibodies to yeast Sm motif 1 croas-react with human Sm core polypeptides. *Eur J Biochem* 261, 371-378.
- Barbacid, M. (1987). ras genes. *Annu Rev Biochem* 56, 779-827.
- Choy, E., Chiu, V. K., Silletti, J., Feoktistov, M., Morimoto, T., Michaelson, D., Ivanov, I. E., and Phillips, M. R. (1999). Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell* 98, 69-80.
- Cleveland, D. W., Fischer, S. G., Kirschner, M. W., and Laemmli, U. K. (1977). Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J Biol Chem* 252, 1102-1106.
- Codony, C., Guil, S., Caudevilla, C., Sena, D., Asins, G., Graessmann, A., Hegardt, F. G., and Bach-Elias, M. (2001). Modulation *in vitro* of H-ras oncogene expression by trans-splicing. *Oncogene* 20, 3683-3694.
- Cohen, J. B., Broz, S. D., and Levinson, A. D. (1989). Expression of the H-ras proto-oncogene is controlled by alternative splicing. *Cell* 58, 461-472.

- Dai, Q., Choy, E., Chiu, V., Romano, J., Slivka, S. R., Steitz, S. A., Michaelis, S., and Philips, M. R. (1998).** Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 273, 15030-15034.
- 5 **de la Iglesia, N., Veiga-da-Cunha, M., van Schaftingen, E., Guinovart, J. J., and Ferrer, J. C. (1999).** Glucokinase regulatory protein is essential for the proper subcellular localisation of liver glucokinase. *FEBS Lett* 456, 332-338.
- 10 **Dignam, J. D., Lebovitz, R. M., and Roeder, R. G. (1983).** Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucl Acids Res* 11, 1475-1489.
- 15 **Esteban, L. M., Vicario-Abejon, C., Fernandez-Salguero, P., Fernandez-Medarde, A., Swaminathan, N., Yienger, K., Lopez, E., Malumbres, M., McKay, R., Ward, J. M., et al. (2001).** Targeted genomic disruption of H-ras and N-ras, individually or in combination, reveals the dispensability of both loci for mouse growth and development. *Mol Cell Biol* 21, 1444-1452.
- 20 **Glisin, V., Crkvenjakov, R., and Byus, C. (1974).** Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry* 13, 2633-2637.
- 25 **Huang, M. Y., and Cohen, J. B. (1997).** The alternative H-ras protein p19 displays properties of a negative regulator of p21Ras. *Oncol Res* 9, 611-621.
- 30 **Ise, K., Nakamura, K., Nakao, K., Shimizu, S., Harada, H., Ichise, T., Miyoshi, J., Gondo, Y., Ishikawa, T., Aiba, A., and Katsuki, M. (2000).** Targeted deletion of the H-ras gene decreases tumor formation in mouse skin carcinogenesis. *Oncogene* 19, 2951-2956.
- 35 **Johnson, L., Greenbaum, D., Cichowski, K., Mercer, K., Murphy, E., Schmitt, E., Bronson, R. T., Umanoff, H., Edelmann, W., Kucherlapati, R., and Jacks, T. (1997).** K-ras is an essential gene in the mouse with partial functional overlap with N-ras. *Genes Dev* 11, 2468-2481.
- 40 **Kaelin, W. G., Jr., Krek, W., Sellers, W. R., DeCaprio, J. A., Ajchenbaum, F., Fuchs, C. S., Chittenden, T., Li, Y., Farnham, P. J., Blanar, M. A., and et al. (1992).** Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. *Cell* 70, 351-364.
- 45 **Koera, K., Nakamura, K., Nakao, K., Miyoshi, J., Toyoshima, K., Hatta, T., Otani, H., Aiba, A., and Katsuki, M. (1997).** K-ras is essential for the development of the mouse embryo. *Oncogene* 15, 1151-1159.
- 50 **Malumbres, M., and Pellicer, A. (1998).** RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front Biosci* 3, d887-912.
- 55 **Porchet, N., and Aubert, J. P. (2000).** Northern blot analysis of large mRNAs. *Methods Mol Biol* 125, 305-312.
- 60 **Reuther, G. W., and Der, C. J. (2000).** The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree. *Curr Opin Cell Biol* 12, 157-165.
- 65 **Romano, J. D., Schmidt, W. K., and Michaelis, S. (1998).** The Desempacharon revisita prenylcysteine carboxyl methyltransferase Stel4p is in the endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell* 9, 2231-2247.
- 70 **Schmidt, W. K., Tamo, A., Jamurabais-Amada, K., and Michaelis, S. (1998).** Cytoplasmic reticulum membrane localizations of Pincela and Ste24p, yeast proteases involved in carboxyl-terminal CAAX protein processing and amino-terminal a-factor cleavage. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 11175-11180.
- 75 **Umanoff, H., Edelmann, W., Pellicer, A., and Kucherlapati, R. (1995).** The murine N-ras gene is not essential for growth and development. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 1709-1713.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico, aislada, seleccionada entre:

- a) una molécula de ácido nucleico que codifica el péptido correspondiente al exón IDX de una proteína p19 H-Ras de mamífero;
- b) una molécula de ácido nucleico que hibrida con dicha molécula de ácido nucleico definida en a) y que codifica el péptido correspondiente al exón IDX de una proteína p19 H-Ras de un mamífero;
- c) una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia codificante degenerada con respecto a la secuencia codificante de la molécula de ácido nucleico definida en a) y en b) y que codifica el péptido correspondiente al exón IDX de una proteína p19 H-Ras de un mamífero; y
- d) una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína p19 H-Ras de mamífero o una forma mutada de dicha proteína con actividad alterada.

2. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, cuya secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo formado por SEQ. ID. NO: 1, SEQ. ID. NO: 2, SEQ. ID. NO: 3, SEQ. ID. NO: 4, SEQ. ID. NO: 5, SEQ. ID. NO: 6, SEQ. ID. NO: 7 y SEQ. ID. NO: 8.

3. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, cuya secuencia de nucleótidos codifica un péptido cuya secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo formado por SEQ. ID. NO: 9, SEQ. ID. NO: 10, SEQ. ID. NO: 11, SEQ. ID. NO: 12, SEQ. ID. NO: 13, SEQ. ID. NO: 14, SEQ. ID. NO: 15 y SEQ. ID. NO: 16, o una proteína cuya secuencia de aminoácidos es la definida en la SEQ. ID. NO: 17.

4. Molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho ácido nucleico se selecciona entre ácido desoxirribonucleico y ácido ribonucleico.

5. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 4, en la que dicha molécula de ácido nucleico es una molécula de ADN.

6. Molécula de ADN según la reivindicación 5, en la que dicha molécula de ADN es una molécula de ADNc.

7. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 4, en la que dicha molécula de ácido nucleico es una molécula de ARN.

8. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 7, en la que dicha molécula de ARN es una molécula de ARN complementaria antisentido (antisense) a la molécula de ácido nucleico definida en la reivindicación 1.

9. Molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que dicha proteína p 19 H-Ras es una forma mutada de una proteína p 19 H-Ras de mamífero con actividad alterada.

10. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

11. Vector según la reivindicación 10, en el que dicho vector se selecciona entre un bacteriófago, un cósmido y un plásmido.

12. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 10 ó 11, en el que dicho vector es un vector adaptado para su expresión en una célula bacteriana que comprende los elementos reguladores necesarios para la expresión en dicha célula bacteriana del ácido nucleico que codifica dicha proteína p19 H-Ras de mamífero o forma mutada de la misma con actividad alterada, localizados respecto a dicho ácido nucleico de tal manera que permiten la expresión de dicho ácido nucleico que codifica dicha proteína p19 H-Ras de mamífero o forma mutada de la misma con actividad alterada.

13. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 10 ó 11, en el que dicho vector es un vector adaptado para su expresión en una célula de levadura que comprende los elementos reguladores necesarios para la expresión en dicha célula de levadura del ácido nucleico que codifica dicha proteína p19 H-Ras de mamífero o forma mutada de la misma con actividad alterada, localizados respecto a dicho ácido nucleico de tal manera que permiten la expresión de dicho ácido nucleico que codifica dicha proteína p19 H-Ras de mamífero o forma mutada de la misma con actividad alterada.

14. Vector según cualquiera de las reivindicaciones 10 ó 11, en el que dicho vector es un vector adaptado para su expresión en una célula de mamífero que comprende los elementos reguladores necesarios para la expresión en dicha célula de mamífero del ácido nucleico que codifica dicha proteína p19 H-Ras de mamífero o forma mutada de la misma con actividad alterada, localizados respecto a dicho ácido nucleico de tal manera que permiten la expresión de dicho ácido nucleico que codifica dicha proteína p19 H-Ras de mamífero o forma mutada de la misma con actividad alterada.

ES 2 242 460 B1

15. Una célula de mamífero que comprende un vector según cualquiera de las reivindicaciones 10 ó 11 o un vector según la reivindicación 14.

16. Una sonda de ácido nucleico que comprende una molécula de ácido nucleico de, al menos, 13 nucleótidos capaz de hibridar específicamente con una secuencia de nucleótidos incluida dentro de la secuencia de una molécula de ácido nucleico definida según los apartados a), b) o c) de la reivindicación 1.

17. Sonda de ácido nucleico según la reivindicación 16, en la que dicho ácido nucleico se selecciona entre ácido desoxirribonucleico y ácido ribonucleico.

18. Sonda de ácido nucleico según la reivindicación 16, en la que dicho ácido nucleico es ARN.

19. Sonda de ácido nucleico según la reivindicación 16, en la que la secuencia de nucleótidos comprende oligonucleótidos degenerados.

20. Un oligonucleótido en sentido contrario (antisense) cuya secuencia de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos capaz de unirse específicamente a una molécula de ARNm codificada por una molécula de ácido nucleico definida según los apartados a), b) o c) de la reivindicación 1, de manera que impida la traducción de la molécula de ARNm.

21. Un oligonucleótido en sentido contrario (antisense) cuya secuencia de nucleótidos comprende una secuencia de nucleótidos capaz de unirse específicamente a una molécula de ADNc según la reivindicación 6.

22. Un oligonucleótido en sentido contrario (antisense) cuya secuencia de nucleótidos comprende una secuencia de oligonucleótidos degenerados de un oligonucleótido en sentido contrario (antisense) según cualquiera de las reivindicaciones 20 ó 21.

23. Oligonucleótido en sentido contrario (antisense) según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, cuya secuencia de nucleótidos comprende análogos químicos de nucleótidos.

24. Un método para detectar la expresión de una proteína p19 H-Ras de mamífero que comprende obtener ARN de células o tejidos de dicho mamífero, poner en contacto dicho ARN con una sonda de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19 bajo condiciones de hibridación, y detectar la presencia de cualquier ARNm hibridado con dicha sonda, en donde la presencia de ARNm hibridado con dicha sonda es indicativa de la expresión de proteína p19 H-Ras de mamífero en dichas células o tejidos de mamífero.

25. Un método para la detección de la expresión específica de una proteína p19 H-Ras de mamífero en una célula o tejido de mamífero por hibridación *in situ*, que comprende poner en contacto dicha célula o tejido con una sonda de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, o bien con un oligonucleótido en sentido contrario (antisense) según cualquiera de las reivindicaciones 20 a 23 bajo condiciones de hibridación, y detectar la presencia de cualquier ARNm hibridado con dicha sonda u oligonucleótido en sentido contrario (antisense), en donde la presencia de ARNm hibridado con dicha sonda o con dicho oligonucleótido es indicativa de la expresión de proteína p19 H-Ras de mamífero.

26. Un método para la detección de un gen que codifica una proteína p19 H-Ras de mamífero, por homología de secuencias de ácidos nucleicos, que comprende el empleo de una sonda de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19.

27. Un método para la detección de un gen que codifica una proteína p19 H-Ras de mamífero que comprende el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa para obtener una molécula de ADN, por homología con la secuencia de una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, útil para detectar un gen que codifica una proteína p19 H-Ras de mamífero.

28. Molécula de ácido nucleico que comprende el gen identificado por el método de cualquiera de las reivindicaciones 26 ó 27.

29. Un método para el aislamiento de una molécula de ADN según la reivindicación 3, que comprende el crecimiento de bacterias transformadas con un vector según la reivindicación 10 que comprende el ADN de la reivindicación 3, la lisis de las células transformadas y la purificación de dicho ADN a partir de las células lisadas.

30. Un péptido o proteína codificado según la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

31. Péptido según la reivindicación 30 codificado por una molécula de ácido nucleico definida en los apartados a), b) o c) de la reivindicación 1.

32. Péptido según la reivindicación 31, cuya secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo formado por SEQ.

ES 2 242 460 B1

ID. NO: 9, SEQ. ID. NO: 10, SEQ. ID. NO: 11, SEQ. ID. NO: 12, SEQ. ID. NO: 13, SEQ. ID. NO: 14, SEQ. ID. NO: 15 y SEQ. ID. NO: 16.

5 33. Proteína según la reivindicación 30 codificada por una molécula de ácido nucleico definida en el apartado e) de la reivindicación 1.

34. Proteína según la reivindicación 33, cuya secuencia de aminoácidos es la definida en la SEQ. ID. NO: 17.

10 35. Un método para la obtención de una proteína p 19 H-Ras de mamífero, según cualquiera de las reivindicaciones 33 ó 34, que comprende inducir células que expresan dicha proteína a expresar dicha proteína p 19 H-Ras de mamífero, recuperar dicha proteína p 19 H-Ras de mamífero de las células resultantes, y purificar dicha proteína p19 H-Ras de mamífero recuperada.

15 36. Un método para la obtención de una proteína p19 H-Ras de mamífero, según cualquiera de las reivindicaciones 30, 33 ó 34, que comprende insertar una molécula de ácido nucleico definida en el apartado d) de la reivindicación 1 que codifica dicha proteína p19 H-Ras de mamífero, en un vector, insertar el vector resultante en una célula huésped, recuperar dicha proteína p19 H-Ras de mamífero producida por la célula resultante, y purificar dicha proteína p19 H-Ras de mamífero recuperada.

20 37. Una proteína de fusión que comprende una proteína p19 H-Ras codificada por una molécula de ácido nucleico definida en el apartado d) de la reivindicación 1, fusionada a una segunda secuencia polipeptídica.

25 38. Proteína de fusión según la reivindicación 37, en el que dicha proteína p19 H-Ras tiene la secuencia de aminoácidos definida en la SEQ. ID. NO: 17.

39. Un anticuerpo seleccionado entre un anticuerpo dirigido contra una proteína p19 H-Ras de mamífero según la reivindicación 33 ó 34, y un anticuerpo dirigido contra un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 30 a 32.

30 40. Anticuerpo según la reivindicación 39, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

41. Un mamífero no humano transgénico, cuyo genoma comprende una molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha molécula de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico humano.

35 42. Un mamífero no humano transgénico, cuyo genoma comprende una molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha molécula de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico humano que está dispuesta de manera que se transcribe en un ARNm en sentido contrario (antisense) complementario del ARNm que codifica una proteína p19 H-Ras humana y se hibrida con el ARNm que codifica una proteína p 19 H-Ras humana para reducir su traducción.

40 43. Mamífero no humano transgénico según cualquiera de las reivindicaciones 41 ó 42, en el que la molécula de ácido nucleico comprende, además, un promotor inducible.

45 44. Mamífero no humano transgénico según cualquiera de las reivindicaciones 41 ó 42, en el que la molécula de ácido nucleico comprende, adicionalmente, elementos reguladores específicos de tejido.

45. Mamífero no humano transgénico según cualquiera de las reivindicaciones 41 ó 42, en el que dicho mamífero no humano transgénico es un ratón.

50 46. Empleo de una proteína p19 H-Ras de mamífero según la reivindicación 33 ó 34, o de una proteína de fusión según la reivindicación 37 ó 38, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

55 47. Empleo de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 39 ó 40, o de un conjugado derivado de dicho anticuerpo o de un fragmento derivado de dicho anticuerpo, en la elaboración de una composición para matar células que tengan un crecimiento descontrolado.

48. Un test para diagnosticar una enfermedad en la que los niveles de expresión de la proteína p19 H-Ras están alterados que comprende el empleo de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 39 ó 40.

60 49. Un método para detectar la proteína p 19 H-Ras de mamífero que comprende el empleo de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 39 ó 40.

50 50. Empleo de un mamífero no humano transgénico según cualquiera de las reivindicaciones 41-45 como modelo para predecir o evaluar posibles aplicaciones terapéuticas de drogas que activan o inhiben la función de la proteína p 19 H-Ras de mamífero mediante la inducción o inhibición de la expresión del gen nativo o del transgén.

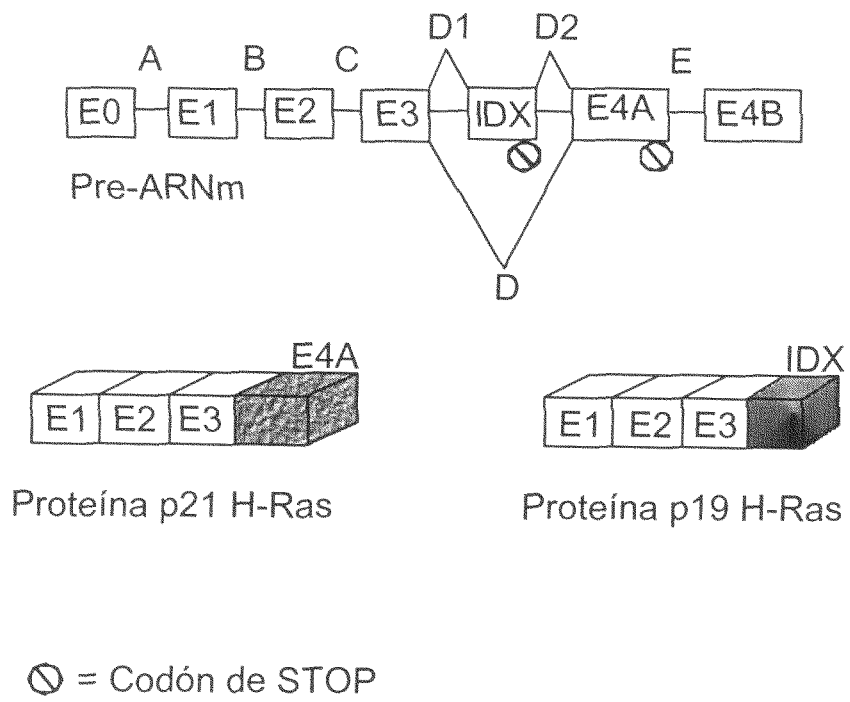
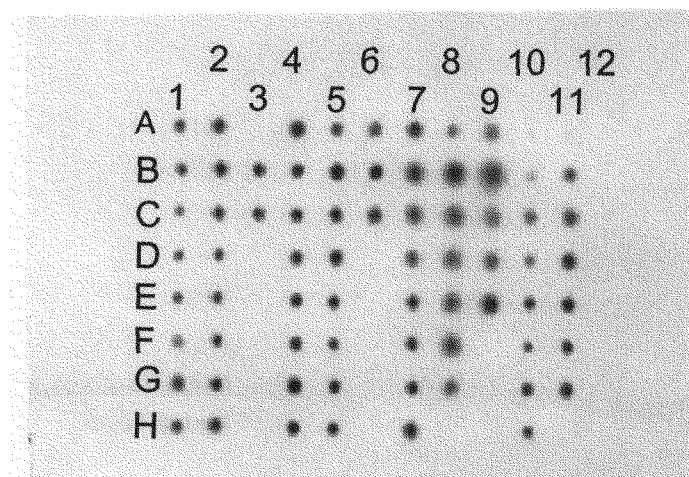


Figura 1



RIBOSONDA ANTI-IDX

Figura 2

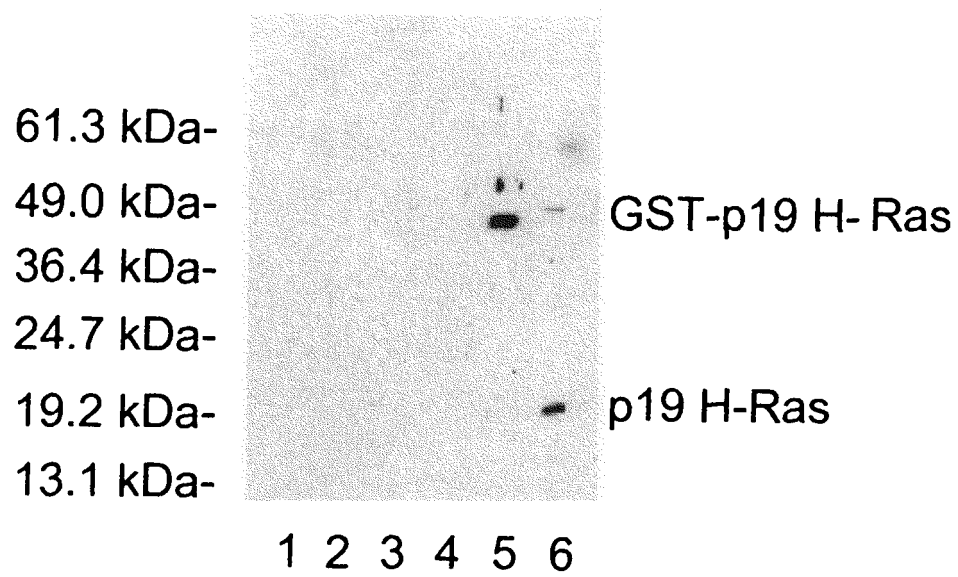


Figura 3

ES 2 242 460 B1

Humana	1	GGCAGCCGCTCTGGCTCTAGCTCC_AGCTCCGGGACCCTCTGGGACCCCCGGGACCCAT	59
Mono	1	GTCAGCCGCTCTGGCTCTGGCTCC_AGCTCCGGGACCCTCTGGGACCCCCGGGACCCAT	59
Buey	1	GGCAGCCGCTCTGGCTCTGGCTCC_AGCTCCGGGACCCTCTGGGACCCCTCCGGGACCCCC	59
Cerdo	1	GGCAGCCGCTCTGGCTCTGGCTCC_GGCTCCGGGACCCTCTGGGACCCCTCCGGGACCCCC	59
Conejo	1	GGCAGCCGCTCTGGCTCTGGCTCC_AGCTCCGGGACCCTCTGGGACCCCCGGGACCCAT	59
Hamster	1	GGCAGCCGCTCTGGCTCTGGCTCC_AGCTCCGGGTCCCTCTGGGACCCCCGGGACCCAT	59
Rata	1	GGCAGCCGCTCTGGCTCTGGCTCC_AGCTCCGGGACCCTCTGGGACCCCCGGGACCCAT	59
Ratón	1	GGCAGCCGCTCTGGCTCCAGCTCCGGGACCCTCTGGGATCCCCCTCCCCGGGACCCAT	60

Consensus GGCAGCCGCTCTGGCTCTGGCTCCGAGCTCCGGGACCCTCTGGGACCCCCGGGACCCAT

Humana	60	GTGACCCAGCGGGCCCCCTCGCGCT	82
Mono	60	GTGACCCAGCGGGCCCCCTCGCGCT	82
Buey	60	GTGACCCAGCGGGCCCCCTCTNGCT	82
Cerdo	60	GTGACCCAGCAGCCCCCTCCTGCT	82
Conejo	60	GTGACCCAGCGGGCCCCCTCGCGCT	82
Hamster	60	GTGACCCAGCGGGCCCCCATGCT	81
Rata	60	GTGACCCATGTGACCCAGCGGGCCCTCATGCT	90
Ratón	61	GTGACCCAGCGGGCCCTCAAGCT	82

Consensus GTGACCCAGCGGGCCCCCTCRGGCTCTCATGCT

Figura 4

ES 2 242 460 B1

Humana	GSRSGSSSSSGTLWDPPGPM
Mono	VSRSGSGSSSGTLWDPPGPM
Buey	GSRSGSGSSSGTLWDPPGPP
Cerdo	GSRSGSGSGSGTLWDPPGPP
Conejo	GSRSGSGSSSGTLWDPPGPM
Hamster	GSRSGSGSSSGSLWDPPGPM
Rata	GSRSGSGSSSGTLWDPPGPM
Ratón	GSRSGS__S_SGTLWDPPSPGTHVTQRPSSWRGGCLLYTSP (38)
Consensus	GSRSGSGSSSGTLWDPPGPMTHVTQRPSSWRGGCLLYTSP
	1 20 40

Figura 5

ES 2 242 460 B1

MTEYKLVVVG AGGVGKSALT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET CLLDILDTAG 60
QEEYSAMRDQ YMRTGEGFLC VFAINNTKSF EDIHQYREQI KRVKDSDDVP MVLVGNKCDL 120
AARTVESRQA QDLARSYGIP YIETSAKTRQ GSRSGSSSSS GTLWDPPGPM

Figura 6

ES 2 242 460 B1

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Fontlab 2000 S.L.
- 5 <120> Ácido nucleico que codifica una proteína p19 H-Ras de mamífero y su exón IDX, péptidos y proteínas codificados por dicho ácido nucleico, y sus aplicaciones
- <130> 200200900
- 10 <140> 200200900
- <141> 2002-04-08
- <160> 28
- <170> PatentIn version 3.1
- 15 <210> 1
- <211> 82
- <212> DNA
- 20 <213> *Homo sapiens*
- <300>
- 25 <301> Sónia Guil, Núria de La Iglesia, Juan Fernández-Larrea, Daniel Cifuentes, Juan C. Ferrer, Joan J. Guinovart and Montse Bach-Elias
- <302> Alternative splicing of the human proto-oncogene c-H-ras renders a new Ras family protein that trafficks to cytoplasm and nucleus
- <303> Cancer Research
- 30 <304> 63
- <305> 17
- <306> 5178-5187
- 35 <307> 2003-09-01
- <308> 14500341
- <309> 2003-09-01
- 40 <400> 1
- ggcagccgct ctggctctag ctccagctcc gggaccctct gggaccccc gggacccatg 60
- tgaccagcg gccctcgcg ct 82
- 45 <210> 2
- <211> 82
- <212> DNA
- 50 <213> *Cercopithecus aethiops*
- <400> 2
- 55 gtcagccgct ctggctctgg ctccagctcc gggaccctct gggaccccc gggacccatg 60
- tgaccagcg gccctcgcg ct 82
- <210> 3
- 60 <211> 78
- <212> DNA
- <213> *Bos taurus*
- 65

ES 2 242 460 B1

<400> 3

	ggcagccgct ctggctctgg ctccagctcc gggaccctct gggaccctcc gggacccccg	60
5	tgaccagcc gcccctct	78

<210> 4

<211> 82

10 <212> DNA

<213> *Sus scrofa*

<400> 4

15	ggcagccgct ctggctctgg ctccgctcc gggaccctct gggaccctcc gggacccccg	60
	tgaccagca gcccctctg ct	82

20 <210> 5

<211> 82

<212> DNA

25 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 5

30	ggcagccgct ctggctctgg ctccagctcc gggaccctct gggaccccc gggaccatg	60
	tgaccagcg gcccctcgcg ct	82

<210> 6

<211> 81

35 <212> DNA

<213> *Mesocricetus auratus*

<400> 6

40	ggcagccgct ctggctctgg ctccagctcc gggaccctct gggaccccc gggaccatg	60
	tgaccagcg gcccctatgc t	81

45 <210> 7

<211> 90

<212> DNA

50 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 7

55	ggcagccgct ctggctctgg ctccagctcc gggaccctct gggaccccc gggaccatg	60
	tgaccatgt gaccagcgg ccctcatgct	90

<210> 8

60 <211> 82

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

65

ES 2 242 460 B1

<400> 8

ggcagccgct ctggctccag ctccgggacc ctctgggatc cccctcccc cgggacccat 60
5 gtgaccacgc ggcctcaag ct 82

<210> 9
<211> 20
10 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 9

15 Gly Ser Arg Ser Gly Ser Ser Ser Ser Ser Gly Thr Leu Trp Asp Pro
1 5 10 15
Pro Gly Pro Met
20

20
<210> 10
<211> 20
25 <212> PRT
<213> *Cercopithecus aethiops*

<400> 10

30 Val Ser Arg Ser Gly Ser Gly Ser Ser Ser Gly Thr Leu Trp Asp Pro
1 5 10 15
Pro Gly Pro Met
20

35
<210> 11
<211> 20
<212> PRT
40 <213> *Bos taurus*

<400> 11

45 Gly Ser Arg Ser Gly Ser Gly Ser Ser Ser Gly Thr Leu Trp Asp Pro
1 5 10 15
Pro Gly Pro Pro
20

50
<210> 12
<211> 20
<212> PRT
55 <213> *Sus scrofa*

<400> 12

60 Gly Ser Arg Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Leu Trp Asp Pro
1 5 10 15
Pro Gly Pro Pro
20

65
<210> 13
<211> 20

ES 2 242 460 B1

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

5 <400> 13

	Gly	Ser	Arg	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Thr	Leu	Trp	Asp	Pro
	1				5					10					15	
10	Pro	Gly	Pro	Met												
				20												

<210> 14

<211> 20

15 <212> PRT

<213> *Mesocricetus auratus*

20 <400> 14

	Gly	Ser	Arg	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Leu	Trp	Asp	Pro
	1				5					10					15	
	Pro	Gly	Pro	Met												
25				20												

<210> 15

<211> 20

30 <212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

35 <400> 15

	Gly	Ser	Arg	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Thr	Leu	Trp	Asp	Pro
	1				5					10					15	
	Pro	Gly	Pro	Met												
40				20												

<210> 16

<211> 27

45 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 16

	Gly	Ser	Arg	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Thr	Leu	Trp	Asp	Pro	Pro	Ser
	1				5					10					15	
	Pro	Gly	Thr	His	Val	Thr	Gln	Arg	Pro	Ser	Ser					
55				20					25							

<210> 17

<211> 170

<212> PRT

60 <213> *Homo sapiens*

65

ES 2 242 460 B1

<400> 17

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

<210> 18

<211> 15

55 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 18

60	Gly	Ser	Arg	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Thr	Leu	Trp	Asp	1	5	10	15
----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---	----	----

65 <210> 19

<211> 20

<212> DNA

ES 2 242 460 B1

	<213> Secuencia artificial	
	<220> DNA sintético	
5	<223> Oligonucleótido E3for	
	<400> 19	
10	ggagcagatc aaacgggtga	20
	<210> 20	
	<211> 20	
15	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220> DNA sintético	
20	<223> Oligonucleótido E4Arev	
	<400> 20	
25	ctgccggatc tcacgcacca	20
	<210> 21	
	<211> 20	
30	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220> DNA sintético	
35	<223> Oligonucleótido ratE4Arev	
	<400> 21	
40	ctagtgtcag gacagcacac	20
	<210> 22	
	<211> 20	
45	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220> DNA sintético	
50	<223> Oligonucleótido IDXfor	
	<400> 22	
55	ggcagccgct ctggctctag	20
	<210> 23	
	<211> 20	
60	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220> DNA sintético	
65	<223> Oligonucleótido D2/848	

ES 2 242 460 B1

	<400> 23	
	agtcctccctc acctgcgtca	20
5	<210> 24	
	<211> 20	
	<212> DNA	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220> DNA sintético	
	<223> Oligonucleótido IDXrev	
15	<400> 24	
	cgcgaggggc cgctgggtca	20
20	<210> 25	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220> DNA sintético	
	<223> Oligonucleótido Elfor	
30	<400> 25	
	cgatgggatc ctatgacgga atataagctg gtggtg	36
35	<210> 26	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220> DNA sintético	
	<223> Oligonucleótido IDX-GSTrev	
45	<400> 26	
	ctgtcgaatt ctcacatggg tccegggggg tccca	35
50	<210> 27	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220> DNA sintético	
	<223> Oligonucleótido p21-GSTrev	
60	<400> 27	
	ctgtcgaatt ctcaggagag cacacacttg cagct	35
65	<210> 28	
	<211> 36	

ES 2 242 460 B1

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

5 <220> DNA sintético

<223> Oligonucleótido GFP-p19 dir

<400> 28

10

ctgtcgaatt ctatgacgga atataagctg gtggtg

36

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 242 460

⑫ Nº de solicitud: 200200900

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 08.04.2002

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.7: C12N 15/11, C07K 14/82, G01N 33/574, C12Q 1/68, C07K 16/32, A01K 67/027

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CODONY, C. et al. "Modulation in vitro of H-ras oncogene expression by trans-splicing". ONCOGENE. 2001. Vol. 20, páginas 3683-3694, todo el documento.	1,4-29
X	BASE DE DATOS EMBL, Hinxton, UK, 01.06.2001. STRAUSBERG, R.L. et al. "V-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog, isoform 2 (P19H-Ras IDX protein)". Nº de acceso Q9BR65, resumen.	34
A	EP 0203587 A1 (F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO.) 03.12.1986, todo el documento.	1-50

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

06.10.2005

Examinador

M. Novoa Sanjurjo

Página

1/1