

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 544**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 51/10 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2004 E 04778578 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2013 EP 1648510**

54 Título: **Anticuerpos de RG1 y sus usos**

30 Prioridad:

22.07.2003 US 489032 P

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

30.10.2013

73 Titular/es:

**BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH
(100.0%)
Alfred-Nobel-Strasse 10
40789 Monheim, DE**

72 Inventor/es:

**HARKINS, RICHARD;
PARKES, DEBORAH;
PARRY, GORDON;
PARRY, RENATE y
SCHNEIDER, DOUGLAS**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 427 544 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

Anticuerpos de RG1 y sus usos

CAMPO DE LA INVENCION

5 Esta invención se refiere a nuevos anticuerpos dirigidos contra un polipéptido, RG1, que se expresa preferentemente en células de la próstata y otras células tumorales. Particularmente, la invención se refiere al uso de estos anticuerpos para el tratamiento y detección de cáncer y metástasis del cáncer.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 El cáncer de próstata es una enfermedad que aparece frecuentemente 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.

15 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 etapas tempranas de la enfermedad dependen de los andrógenos, mientras que las etapas posteriores son independientes de las hormonas. A menudo se detecta clínicamente un trastorno proliferativo de la próstata conocido como hiperplasia prostática benigna, 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. Los cánceres en etapa avanzada se metastatizan frecuentemente a los ganglios linfáticos y al hueso.

25 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 antiandrogénica. Sin embargo, la enfermedad avanzada se hace casi invariablemente resistente 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. Éstos incluyen un elevado riesgo de incontinencia e impotencia asociadas a la prostatectomía radical y fracturas óseas y osteoporosis asociadas a la terapia por ablación androgénica.

30 En consecuencia, existe una considerable necesidad de nuevos enfoques terapéuticos para cáncer de próstata tanto en etapa precoz como avanzada. Existe también una necesidad significativa de nuevos agentes de diagnóstico, ya que esto determina significativamente las opciones de tratamiento. Por ejemplo, si la enfermedad ha progresado más allá de la próstata y se ha metastatizado a los ganglios linfáticos, no se lleva a cabo la prostatectomía radical, ya que 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*.

35 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 de etapa avanzada, niveles reducidos de receptores TGF- β , niveles reducidos de E-cadherina, C-Cam (una molécula de adhesión celular), y varias integrinas. La expresión del oncogén bcl-2 es sorprendentemente elevada en los tumores independientes de andrógenos de etapa avanzada, y el pronóstico para los pacientes con expresión de bcl-2 a 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 que podrían servir como dianas moleculares para composiciones dirigidas al diagnóstico y terapia del cáncer de próstata.

40 El polipéptido RG1 (véase la patente U.S. 5.871.969 y el documento WO 01/44291) es un homólogo de la familia de Mindina/F-espondina, que son proteínas de la matriz extracelular. Se demostró que el polipéptido RG1 está muy expresado en tejido de próstata (véase el documento WO98/45442), y debería ser una diana útil para el diagnóstico y terapia de cáncer de próstata, así como en otros cánceres en los que se expresa.

SUMARIO DE LA INVENCION

45 La presente invención proporciona, en particular, anticuerpos monoclonales humanos o sus fragmentos de anticuerpos que se unen a antígeno, o sus variantes, que son muy selectivos por los polipéptidos RG1, y que se pueden emplear en métodos para la detección de la expresión de RG1, que está asociada con estados mórbidos tales como cáncer de la próstata, riñón, colon u ovarios, y en el tratamiento de tales estados mórbidos.

Para estos fines, es un objeto de la invención proporcionar anticuerpos aislados, o sus fragmentos de anticuerpos que se unen a antígeno, o sus variantes, que se unen específicamente a un epítipo presente en un polipéptido RG1 (SEC ID NO: 2). Se prefieren particularmente anticuerpos humanos que se unen al epítipo del polipéptido RG1 con una constante de disociación (K_D) que es menor o igual a $1 \mu\text{M}$, más particularmente menor o igual a 100 nM, y lo más preferible menor o igual a 10 nM.

La presente invención proporciona un anticuerpo humano monoclonal aislado o su fragmento de unión a antígeno, en el que el anticuerpo comprende: a) una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 26, y b) una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 27 o SEC ID NO: 28, en el que el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une específicamente a un epítipo presente en un polipéptido RG1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2; y muestra una elevada acumulación específica del tumor de manera que inhibe el crecimiento de células tumorales que expresan RG1 cuando se conjuga con un agente citotóxico.

También se proporciona un anticuerpo humano monoclonal aislado o su fragmento de unión a antígeno, en el que el anticuerpo comprende: a) una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 29, y b) una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 30 o SEC ID NO: 31, en el que el anticuerpo o su fragmento de unión a antígeno se une específicamente a un epítipo presente en un polipéptido RG1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2; y muestra una elevada acumulación específica del tumor de manera que inhibe el crecimiento de células tumorales que expresan RG1 cuando se conjuga a un agente citotóxico.

Según realizaciones preferidas adicionales de la invención, se proporcionan anticuerpos aislados y sus fragmentos de anticuerpos que se unen a antígeno, que comprenden una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de SEC ID NO: 26 o SEC ID NO: 29.

También se proporcionan anticuerpos aislados y sus fragmentos de anticuerpos que se unen a antígeno, que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEC ID NO: 27, SEC ID NO: 28, SEC ID NO: 30 o SEC ID NO: 31. Una realización particularmente preferida es un anticuerpo humano que comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 26 y una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 27 o SEC ID NO: 28. Una segunda región particularmente preferida es un anticuerpo humano, que comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 29 y una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 30 o SEC ID NO: 31.

También se describen aquí secuencias nucleotídicas que codifican las regiones variables de cadena ligera y de cadena pesada de los anticuerpos descritos anteriormente. Se describe aquí un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera codificada por una secuencia nucleotídica que comprende SEC ID NO: 20 o SEC ID NO: 23. También se describe aquí un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada codificada por una secuencia nucleotídica que comprende SEC ID NO: 21, SEC ID NO: 22, SEC ID NO: 24, o SEC ID NO: 25.

Según ciertas realizaciones preferidas de este aspecto de la invención, los anticuerpos se conjugan a un marcador detectable, para uso como un agente de diagnóstico para la administración a células *in vitro*, a células *ex vivo* y a células *in vivo*, o a un organismo multicelular. Sería particularmente preferido un anticuerpo conjugado a un radiomarcador, una enzima, un cromóforo o un agente fluorescente. Los métodos de detección particularmente preferidos son inmunoscintigrafía y tomografía de emisión positrónica, en los que el anticuerpo se conjugaría a un radioisótopo tal como ^{111}In o $^{99\text{m}}\text{Tc}$, para inmunoscintigrafía, o a ^{43}Sc , ^{44}Sc , ^{52}Fe , ^{55}Co , ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{88}Y o $^{94\text{m}}\text{Tc}$, para tomografía de emisión positrónica.

En un aspecto adicional de la invención, se proporcionan anticuerpos que se conjugan a un agente terapéutico, por ejemplo ricina o un radioisótopo, para la administración a células *in vitro*, a células *ex vivo* y a células *in vivo*, o a un organismo multicelular. A este respecto se prefieren agentes terapéuticos que son citotóxicos. Particularmente preferidos para un agente terapéutico serían anticuerpos conjugados a un radioisótopo, tal como ^{90}Y y ^{177}Lu . En ciertas realizaciones preferidas, a este respecto, es la administración de tales anticuerpos conjugados a un paciente humano para el tratamiento de un estado mórbido caracterizado por la expresión de RG1, tal como cáncer de próstata, y en particular cáncer de próstata metastásico avanzado.

En un aspecto adicional de la invención, la conjugación de un anticuerpo de RG1, o su fragmento de unión a antígeno, a un marcador detectable o agente citotóxico se logra mediante el uso de un quelador seleccionado del grupo que consiste en p-SCN-bencil-DTPA y sus derivados, ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) y sus derivados, y ácido 1,4,7-triazaciclononano-N,N',N''-triacético (NOTA) y sus derivados.

En una realización adicional, se proporciona un inmunocombinado o anticuerpo humano aislado de la invención para uso en terapia o diagnóstico.

También está englobado por la presente invención el uso de un inmunoconjugado o anticuerpo humano aislado de la invención para la preparación de una composición farmacéutica para tratar o diagnosticar cáncer.

En otra realización, se proporciona un inmunoconjugado o anticuerpo humano aislado de la presente invención para uso en el tratamiento o diagnóstico del cáncer.

- 5 Los péptidos y anticuerpos antiidiotípicos proporcionados se pueden usar para estimular una respuesta inmunitaria.

Otros objetos, características, ventajas y aspectos de la presente invención serán manifiestos para los expertos a partir de la siguiente descripción. Sin embargo, se debería entender que la siguiente descripción y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones preferidas de la invención, se dan sólo a título de ilustración.

10 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIGURA 1: Biodistribución de anticuerpos de RG1 marcados con ^{111}In : Se radiomarcaron con ^{111}In tres anticuerpos de RG1 (A, B, y C), un anticuerpo de control hIgG₁ no específico, y Proscint™. Los anticuerpos radiomarcados (actividad específica: 0,3 mCi/mg) se administraron i.v. en ratones atímicos que poseen tumor (LNCaP). Se sacrificaron doce animales por grupo (3 animales por punto de tiempo) a 6, 24, 120, y 150 h p.l., y se monitorizó la acumulación en el tumor, sangre e hígado. (Véase Ejemplo 11)

FIGURA 2: Efecto antitumoral de anticuerpos de RG1 marcados con ^{90}Y : Se inyectó a animales que poseen tumor LNCaP con anticuerpos marcados con ^{90}Y (anticuerpos B y C anti-RG1, o IgG₁ no específico, actividad específica 0,5 mCi/mg). Se administró i.p. una única dosis de 125 μCi de anticuerpo de RG1 marcado con ^{90}Y (B, C). Los ratones se sacrificaron en el día 32, y los tumores se cortaron y se pesaron. (Véase el Ejemplo 12).

FIGURA 3: Secuencia de aminoácidos de las regiones de cadena variable del anticuerpo monoclonal humano B, incluyendo una región de cadena pesada variable mutada. V_L (SEC ID NO: 26), V_H (SEC ID NO: 27), B-3M, V_H (SEC ID NO: 28).

FIGURA 4: Secuencia de aminoácidos de las regiones de cadena variable del anticuerpo monoclonal humano C, incluyendo una región de cadena pesada variable mutada. V_L (SEC ID NO: 29), V_H (SEC ID NO: 30), C-2m, V_H (SEC ID NO: 31).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

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

“*rg1*” se refiere al polinucleótido que presenta la secuencia indicada en SEC ID n°: 1 y a los polinucleótidos que codifican polipéptidos que presentan la secuencia de aminoácidos de RG1 indicada en SEC ID n°: 2; y a polinucleótidos que codifican variantes, análogos, derivados y fragmentos, y fragmentos de las variantes 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 polipeptídica indicada en SEC ID n°: 2.

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

“Actividad biológica” se refiere a las funciones estructurales, reguladoras o bioquímicas del polipéptido RG1 de origen natural.

“Actividad inmunológica” se refiere a (1) la capacidad del RG1 natural, recombinante o sintético, o de cualquier fragmento del mismo, para inducir una respuesta inmunitaria específica en animales o células apropiados y para unirse a anticuerpos específicos, o (2) la capacidad de los anticuerpos contra RG1 para unirse a RG1 *in vivo* y disparar una respuesta inmunitaria celular potenciada frente a tejido o tumor que expresa RG1.

“RG1 de origen natural” se refiere a RG1 producido por células humanas no modificadas genéticamente, y contempla específicamente diversas formas de RG1 surgidas de modificaciones postraduccionales del polipéptido, incluyendo, pero sin limitarse a las mismas, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación, acilación y escisión.

“RG1 nativo” o “nRG1” se refiere a RG1 que está en su conformación nativa.

“Polinucleótido” o “polinucleótidos” se refiere generalmente a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. Así, por ejemplo,

“polinucleótido”, tal como se usa aquí, 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, o una mezcla de regiones de cadena simple y de cadena doble. Además, polinucleótido, tal como se usa aquí, se refiere a regiones de cadena triple que comprenden ARN o ADN, o tanto ARN como 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 usa aquí, el término “polinucleótido” incluye ADN o ARN, tales como se han 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 sólo 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 fines útiles conocidos por los expertos en la materia. El término “polinucleótido”, tal como se usa aquí, incluye dichas formas de polinucleótidos modificadas química, enzimática o metabólicamente, así como las formas químicas de ADN y ARN características de los virus y las células, incluyendo células simples y complejas, *entre otros*.

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 sondas 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. “Oligonucleótidos” u “oligómeros”, o “fragmento”, “parte” o “segmento” de polinucleótido se refiere a una secuencia polinucleotídica de al menos aproximadamente 10 nucleótidos y hasta aproximadamente 60 nucleótidos, preferentemente aproximadamente 15 a 30 nucleótidos, y más preferentemente aproximadamente 20 a 25 nucleótidos.

“Polipéptidos”, tal como se usa aquí, 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 usa aquí, el término se refiere tanto a cadenas cortas, designadas también comúnmente en la técnica péptidos, oligopéptidos y oligómeros, por ejemplo, y a 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 origen natural, y que muchos aminoácidos, incluyendo los aminoácidos terminales, pueden ser modificados en un polipéptido determinado, ya sea mediante procesos naturales, tales como glucosilación y otras modificaciones postraduccionales, o mediante técnicas de modificación química bien conocidas en la técnica. Las modificaciones comunes incluyen glucosilación, enlazamiento lipídico, sulfación, gamma carboxilación de restos de ácido glutámico, hidroxilación y ADP-ribosilación, y éstas y otras han sido descritas en muchos textos básicos, tales 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, tales como, por ejemplo, Wold. F., en *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, p 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, que 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 postraduccionales, incluyendo fenómenos de procesamiento natural y fenómenos provocados por manipulación humana que no tienen lugar de forma natural. Los polipéptidos circulares, ramificados y ramificados circulares también se pueden sintetizar mediante procedimientos naturales no traduccionales, 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 de ambos, mediante una modificación covalente, es común en polipéptidos de origen natural y polipéptidos sintéticos, y dichas modificaciones pueden estar presentes también en los polipéptidos según la presente invención. Por ejemplo, el resto amino terminal 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, para los polipéptidos preparados expresando un gen clonado en un hospedante, la naturaleza y grado de las modificaciones vendrá determinada en gran medida por la capacidad de modificación postraducciona

5 la célula hospedante y las señales de modificación presentes en la secuencia de aminoácidos del polipéptido. Por ejemplo, tal como es bien conocido, a menudo la glucosilación no tiene lugar en hospedantes bacterianos tales como *E. coli*. Correspondientemente, cuando se desea llevar a cabo una glucosilación, un polipéptido se debe expresar en un hospedante glucosilante, generalmente una célula eucariota. A menudo las células de insectos llevan a cabo las mismas glucosilaciones postraduccionales 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 glucosilación, *entre otros*. Se aplican consideraciones similares a otras modificaciones.

En general, tal como se usa aquí, el término polipéptido comprende todas estas modificaciones, particularmente las que están presentes en los polipéptidos sintetizados expresando un polinucleótido en una célula hospedante.

15 “Derivado” se refiere a polinucleótidos o polipéptidos derivados de *rg1* de origen natural, RG1, o de anticuerpos que se unen a RG1, respectivamente, mediante modificaciones químicas, tales como ubiquitinación, marcado (por ejemplo, radionúclidos, 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.

20 “Polinucleótido que codifica un polipéptido”, tal como se usa aquí, 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 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.

25 Un “fragmento”, “parte” o “segmento” polipeptídico es un tramo de restos 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. 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, o anticuerpos frente a RG1, y variantes o derivados de los mismos.

30 “Eliminación” se define como un cambio en las secuencias polinucleotídicas o de aminoácidos en el que están ausentes uno o más polinucleótidos o restos de aminoácidos, respectivamente.

Una “inserción” o “adición” es aquel cambio en una secuencia polinucleotídica o de aminoácidos que ha comportado la adición de uno o más polinucleótidos o restos de aminoácidos, respectivamente, en comparación con la secuencia polinucleotídica o la secuencia de aminoácidos de origen natural.

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

“Variante” o “variantes” de polinucleótidos o polipéptidos, tal como se usa el término aquí, se describen a continuación y en otros puntos de la presente descripción con mayor detalle.

40 Una variante de un polinucleótido es un polinucleótido que difiere en secuencia polinucleotídica de otro polinucleótido de referencia. Generalmente, las diferencias son limitadas, de tal modo que las secuencias polinucleotídicas de la referencia y la variante son muy similares en conjunto y, en muchas regiones, idénticas.

Los cambios en la secuencia polinucleotídica de la variante pueden ser silenciosos. Es decir, pueden no alterar los aminoácidos codificados por el polinucleótido. En el caso en el que las alteraciones se limiten a cambios silenciosos 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 polinucleotídica 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 truncamientos de aminoácidos en el polipéptido codificado por la secuencia de referencia, tal como se describe a continuación.

50 Una variante de un polipéptido es un polipéptido que difiere en 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 truncamientos, que se pueden presentar en cualquier combinación. Se pueden sintetizar o seleccionar variantes recombinantes que codifican los mismos polipéptidos o polipéptidos similares utilizando la “redundancia” en el código genético. Se pueden introducir diversas sustituciones de codón, tales como los cambios silenciosos que producen diversos sitios de restricción, a efectos de optimizar la clonación en un plásmido o vector viral, o la

expresión en un sistema procariota o eucariota particular. También se pueden introducir mutaciones a efectos de modificar las propiedades del polipéptido, para cambiar las afinidades de unión a ligandos, las afinidades entre cadenas, o la velocidad de degradación o recambio del polipéptido.

5 Como se explica aquí, se contemplan variaciones pequeñas en las secuencias de aminoácidos de polipéptidos, anticuerpos o moléculas inmunoglobulínicas como englobadas por la presente invención, con la condición de que las variaciones en la secuencia de aminoácidos mantengan al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, 90%, 95%, y lo más preferible 99% de la secuencia original. En particular, se contemplan sustituciones conservativas de aminoácidos. Las sustituciones conservativas son aquellas que tienen lugar en una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales. Los aminoácidos codificados genéticamente se dividen generalmente en familias: (1) ácidos (aspartato, glutamato); (2) básicos (lisina, arginina, histidina); (3) no polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano); y (4) polares no cargados (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina). Las familias más preferidas son: la serina y treonina son una familia hidroxílica alifática; la asparagina y glutamina son una familia que contiene amida; alanina, valina, leucina e isoleucina son una familia alifática; y fenilalanina, triptófano y tirosina son una familia aromática. Por ejemplo, es razonable esperar que una sustitución aislada de una leucina por una isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato, una treonina por una serina, o una sustitución similar de un aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado no tendrá un efecto importante sobre la unión o propiedades de la molécula resultante, especialmente si la sustitución no implica un aminoácido con sitio de armazón. El hecho de que un cambio de aminoácido dé como resultado un péptido funcional se puede determinar fácilmente comparando la actividad específica del derivado polipeptídico con el polipéptido sin modificar. Para los fines de esta solicitud, la invención engloba variantes de los anticuerpos reivindicados, que mantienen una afinidad de unión (K_D) menor que 1 μ M por un epítipo de RG1.

Las siguientes expresiones se usan para describir las relaciones de secuencia entre dos o más secuencias polinucleotídicas o de aminoácidos: "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia", "identidad sustancial", "similitud", y "homólogo". Una "secuencia de referencia" es una secuencia definida usada como base para una comparación de secuencias; una secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande, por ejemplo como un segmento de una secuencia génica o de ADNc de longitud completa dada en un listado de secuencias, o puede comprender una secuencia completa de ADNc o secuencia génica. Generalmente, una secuencia de referencia tiene una longitud de al menos 18 nucleótidos o 6 aminoácidos, frecuentemente una longitud de al menos 24 nucleótidos u 8 aminoácidos, y a menudo una longitud de al menos 48 nucleótidos o 16 aminoácidos. Puesto que dos secuencias polinucleotídicas o de aminoácidos pueden cada una (1) comprender una secuencia (es decir, una porción de la secuencia polinucleotídica o de aminoácidos completa) que es similar entre las dos moléculas, y (2) pueden comprender además una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos o secuencias de aminoácidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) moléculas se llevan a cabo típicamente comparando secuencias de las dos moléculas a lo largo de una "ventana de comparación", para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación", como se usa aquí, se refiere a un segmento conceptual de al menos 18 posiciones nucleotídicas contiguas o 6 aminoácidos en el que una secuencia polinucleotídica o secuencia de aminoácidos se puede comparar con una secuencia de referencia de al menos 18 nucleótidos contiguos o 6 aminoácidos, y en el que la porción de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones, eliminaciones, sustituciones y similares (es decir, saltos) de 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El alineamiento óptimo de secuencias para alinear una ventana de comparación se puede llevar a cabo mediante un algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante la búsqueda de método de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:2444 (1988), mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), Geneworks, o paquetes de software MacVector), o mediante inspección, y se selecciona el mejor alineamiento (es decir, que da como resultado el porcentaje más elevado de homología a lo largo de la ventana de comparación) generado por los diversos métodos.

La expresión "identidad de secuencia" significa que dos secuencias polinucleotídicas o de aminoácidos son idénticas (es decir, en una base de nucleótido a nucleótido o resto a resto) a lo largo de una ventana de comparación. La expresión "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias óptimamente alineadas a lo largo de la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que se aparece la base (por ejemplo, A, T, C, G, U, o I) o resto de ácido nucleico idéntico en ambas secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. La expresión "identidad sustancial", como se usa aquí, representa una característica de una secuencia polinucleotídica o de aminoácidos, en la que el polinucleótido o aminoácido comprende una secuencia que tiene al menos 85 por ciento de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 90 a 95 por ciento de identidad de secuencia, más habitualmente al menos 99 por ciento de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de referencia a lo largo de una ventana de comparación de al menos 18 posiciones nucleotídicas (6 aminoácidos), frecuentemente a lo largo de una ventana

de al menos 24-48 posiciones nucleotídicas (8-16 aminoácidos), en el que el porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia de referencia con la secuencia que puede incluir eliminaciones o adiciones que asciende a 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia a lo largo de la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande. El término "similitud", cuando se usa para describir un polipéptido, se determina comparando la secuencia de aminoácidos y los sustitutos de aminoácidos conservados de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido. El término "homólogo", cuando se usa para describir un polinucleótido, indica que dos polinucleótidos, o sus secuencias designadas, cuando están óptimamente alineadas y se comparan, son idénticos, con inserciones o eliminaciones nucleotídicas apropiadas, en al menos 70% de los nucleótidos, habitualmente de alrededor de 75% a 99%, y más preferiblemente al menos alrededor de 98 a 99% de los nucleótidos.

"Anticuerpo" o "fragmento de anticuerpo que se une a antígeno" se refiere a un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo, que compite con el anticuerpo intacto por la unión específica. Se afirma que un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a antígeno se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación es menor o igual a 1 μ M, preferiblemente menor o igual a 100 nM, y lo más preferible menor o igual a 10 nM. La unión se puede medir mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, siendo un ejemplo el uso de un instrumento BIAcore™. Los fragmentos de anticuerpo comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región variable o de unión a antígeno del anticuerpo intacto. Los fragmentos de unión incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; dianticuerpos, anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo (C. A. K Borrebaeck, editor (1995) Antibody Engineering (Breakthroughs in Molecular Biology), Oxford University Press; R. Kontermann & S. Duebel, editores (2001) Antibody Engineering (Springer Laboratory Manual), Springer Verlag). Se entiende que un anticuerpo distinto de un anticuerpo "bienespecífico" o "bifuncional" tiene idénticos cada uno de sus sitios de unión.

"Epítipo" incluye cualquier determinante proteico capaz de unirse específicamente a un receptor inmunoglobulínico o de célula T. Los determinantes epítópicos consisten habitualmente en agrupamientos de moléculas superficiales químicamente activos tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar, y tienen habitualmente características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Se afirma que dos anticuerpos se "unen al mismo epítipo" si se muestra que un anticuerpo compite con el segundo anticuerpo en un ensayo de unión competitiva, mediante cualquiera de los métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

"Recombinante" o "molécula de ADN recombinante" se refiere a una secuencia polinucleotídica que no tiene origen natural, o se obtiene de la combinación artificial de dos segmentos de secuencia de otro modo separados. La expresión "producido recombinantemente" se refiere a una combinación artificial frecuentemente lograda 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 realiza para 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 lleva a cabo para unir segmentos polinucleotídicos con las funciones deseadas para 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 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 vectores de clonación y de expresión. "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 un polipéptido de origen natural 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 está "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 medios de formulaciones, disoluciones para la introducción de polinucleótidos o polipéptidos, por ejemplo, en células, composiciones o disoluciones para llevar a cabo reacciones químicas o enzimáticas, por ejemplo, que no son composiciones de origen natural, y en las mismas permanecen polinucleótidos o polipéptidos aislados 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 polinucleotídico 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, o 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 estará sustancialmente libre de sus componentes asociados naturalmente.

La expresión "reacción en cadena de la polimerasa" o "PCR" se refiere a un procedimiento en el que se amplifican trozos específicos de ADN, tal como se describe en la patente US n° 4.683.195, publicada el 28 de julio de 1987. Generalmente, se requiere información de secuencia de los extremos del fragmento polipeptídico de interés o de más allá, de tal modo que se puedan diseñar cebadores oligonucleotídicos; dichos cebadores apuntarán el uno hacia el otro, y serán idénticos o similares en secuencia a las cadenas opuestas del molde que se pretende amplificar. Los nucleótidos terminales en 5' 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 genómico total, ADNc transcrito a partir de ARN total celular, secuencias plasmídicas, etc. (véase generalmente Mullis et al, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51: 263,1987; Erlich, ed., PCR Technology, Stockton Press, NY, 1989).

"Rigurosidad" 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) hasta aproximadamente de 20°C a 25°C por debajo de la T_m . Tal como entenderán los expertos en la técnica, se puede utilizar una hibridación rigurosa para identificar o detectar secuencias polinucleotídicas idénticas, o para identificar o detectar secuencias polinucleotídicas similares o relacionadas. Tal como se usa aquí, la expresión "condiciones rigurosas" significa que la hibridación tendrá lugar únicamente si existe como mínimo un 95%, y preferentemente como mínimo un 97%, de identidad entre las secuencias.

"Hibridación", tal como se usa aquí, puede incluir "cualquier procedimiento por el que una cadena polinucleotídica 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 eficaz" 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. Una dosis se considera una dosis terapéuticamente eficaz en el tratamiento del cáncer o su metástasis cuando el crecimiento tumoral o metastático se ralentiza o se detiene, o se encuentra que el tumor o la metástasis se contrae en tamaño, para conducir a una prolongación en el tiempo de vida para el sujeto. Una dosis también se considera terapéuticamente eficaz si conduce a una mejora en la calidad global de vida del paciente, es decir, alivio del dolor. 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 eficaz 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, estado mórbido el cual incluye estados mórbidos que se caracterizan por un nivel aumentado de RG1, tal como cáncer de próstata o cáncer de próstata metastásico avanzado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Anticuerpos

La presente invención se refiere a anticuerpos, a sus fragmentos de anticuerpo que se unen a antígeno, y a variantes de los anticuerpos y fragmentos, que se unen específicamente a un epítipo presente en un polipéptido RG1, particularmente al polipéptido RG1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2. Estos anticuerpos son anticuerpos monoclonales humanos.

Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo que se unen a antígeno, y variantes de los anticuerpos y fragmentos, contemplados en la presente invención, se unen a un epítipo del polipéptido RG1 con una constante de disociación (K_D) menor o igual a $1\ \mu\text{M}$. Son más preferidos los anticuerpos que se unen con una K_D menor o igual a $100\ \text{nM}$. Son muy preferidos los anticuerpos que se unen con una K_D menor o igual a $10\ \text{nM}$. También se contemplan anticuerpos que reconocen y se unen al mismo epítipo que el epítipo unido por los anticuerpos descritos más abajo, y que se pueden determinar a través de estudios de unión competitiva, usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica.

Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpo que se unen a antígeno, y variantes de los anticuerpos y fragmentos de la invención comprenden una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada. Entre las realizaciones de la invención, a este respecto, se encuentran anticuerpos, sus fragmentos de anticuerpo que se unen a antígeno, o sus variantes, que comprenden una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, todavía más preferiblemente 99% de identidad de secuencia con las secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 26 o SEC ID NO: 29. También son realizaciones preferidas los anticuerpos, sus fragmentos de anticuerpo que se unen a antígeno, o sus variantes, que comprenden una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, todavía más preferiblemente 99% de identidad de secuencia con las secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 27, SEC ID NO: 28, SEC ID NO: 30 o SEC ID NO: 31 (véanse las Figuras 3 y 4).

Son realizaciones particularmente preferidas de la invención los anticuerpos o sus fragmentos de anticuerpo que se unen a antígeno, o sus variantes, que comprenden una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 26 o SEC ID NO: 29, que son codificados por las secuencias nucleotídicas de SEC ID NOS: 20 y 23, respectivamente.

- 5 También se prefieren particularmente anticuerpos, o sus fragmentos de anticuerpo que se unen a antígeno, o sus variantes, que comprenden una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos escogida de SEC ID NOS: 27, 28, 30 o 31, que son codificados por las secuencias nucleotídicas SEC ID NOS. 21, 22, 24 y 25, respectivamente.

- 10 A este respecto, se prefieren más particularmente un anticuerpo, o su fragmento de anticuerpo que se une a antígeno, o una variante del mismo, que comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 26 y que comprende además una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 27 o SEC ID NO: 28, y un segundo anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 29 y que comprende además una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 30 o SEC ID NO: 31.

- 15 Son muy preferidos los anticuerpos humanos, sus fragmento de anticuerpo que se unen a antígeno, o sus variantes, según lo siguiente: (a) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 26 y una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 27, (b) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 26 y una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 28, (c) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 29 y una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 30, o (d) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 29 y una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos SEC ID NO: 31.

25 Producción de anticuerpos

- Los polipéptidos RG1, fragmentos o derivados, o células que los expresan, se pueden utilizar como un inmunógeno para producir anticuerpos frente a los mismos (Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press, NY (1989)). Para la producción de tales anticuerpos y fragmentos, se pueden usar diversos procedimientos conocidos en la técnica (C. A. K Borrebaeck, editor (1995) Antibody Engineering (Breakthroughs in Molecular Biology), Oxford University Press; R. Kontermann y S. Duebel, editores (2001) Antibody Engineering (Springer Laboratory Manual), Springer Verlag).

- Los anticuerpos generados contra RG1 se pueden obtener por inyección directa de los polipéptidos en un animal, o administrando los polipéptidos a un animal, preferentemente no humano. El anticuerpo obtenido de este modo se unirá a continuación a los propios polipéptidos. De este modo, se puede utilizar incluso una secuencia que codifica únicamente un fragmento de los polipéptidos a efectos de generar anticuerpos que se unen a los polipéptidos nativos enteros. A continuación, dichos anticuerpos se pueden utilizar para aislar el polipéptido del tejido que expresa dicho polipéptido. Los métodos alternativos que no requieren el uso de proteína RG1 purificada o péptidos RG1 para generar anticuerpos frente a RG1 incluyen "inmunización de ADN", en la que se crea un vector de expresión o virus usando un ADN que codifica RG1 y se usa para transfectar o infectar células tisulares hospedantes para expresar RG1 en un animal usado para generar anticuerpos, o inmunización a base de células, en la que, en el procedimiento de inmunización, se usan estirpes celulares que expresan RG1 creadas *in vitro*.

- Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos mediante cultivos continuos de estirpes 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 del EBV, para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al, en Monoclonal Antibodies and Cancer, Alan R. Liss, Inc., 77-96, 1985). Para las inmunizaciones a base de células que usan estirpes celulares que expresan RG1, se puede usar la inmunización de sustracción, para hacer a los animales tolerantes inmunológicamente a la estirpe celular progenitora (Sleister, H. M. y Rao, A. G., J. immunological Methods 261:213-220, 2002).

- Además, se pueden utilizar técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos", ajuste de genes de anticuerpos de ratón a genes de anticuerpos humanos para 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, se pueden adaptar las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (patente US nº 4.946.778) para producir anticuerpos monocatenarios 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, o mediante el uso del Xenomouse™, como se describe en Mendez et al. Nature Genetics 15:146-156, 1997. Tales anticuerpos se pueden generar también usando tecnología de presentación de fagos (Rader et al., Current Opinion in Biotechnology 8:155-168, 1997; Aujame et al., Human Antibodies 8:155-168,

1997). La generación de anticuerpos humanos es muy atractiva, por cuanto se espera que tales anticuerpos minimicen las respuestas inmunógenas y alérgicas intrínsecas de anticuerpos monoclonales de ratón o derivados de ratón. La generación de anticuerpos humanos que reconocen epítomos del polipéptido RG1 (SEC ID n°: 2) se describe en el Ejemplo 4.

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

10 También se pueden generar fragmentos de anticuerpo que contienen sitios de unión específica para RG1. A menudo hay ventajas a la hora de usar fragmentos de anticuerpo, en lugar de anticuerpos completos, puesto que el tamaño más pequeño de los fragmentos puede conducir a un aclaramiento más rápido, y también puede proporcionar un acceso mejorado a tumores sólidos.

15 Tales fragmentos incluyen, sin limitarse a los mismos, los fragmentos F(ab')₂, que pueden ser producidos por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo, y los fragmentos Fab, que se pueden generar reduciendo los puentes de disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. 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). Los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y ScFv se pueden expresar todos en y se pueden segregar a partir de *E. coli*, o una variedad de sistemas de expresión de células eucariotas, que permiten la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Como alternativa, los
 20 fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente a partir de *E. coli* y se pueden acoplar para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo son conocidas por los expertos en la técnica. También se prevén fragmentos Fv monocatenarios (scFv), dianticuerpos, minicuerpos y otros fragmentos de anticuerpo manipulados mediante ingeniería (véanse las patentes U.S. n°s 5.576.1894 y 5.587.458; Hudson et al. Nature Medicine 9:129-133, 2003)).
 25 Los fragmentos Fv y sFv son ejemplos de especies con sitios de combinación intactos que están desprovistos de regiones constantes; de este modo, es probable que muestren unión no específica reducida durante el uso *in vivo*, y se prefieren particularmente para uso como agentes formadores de imágenes (C. A. K Borrebaeck, editor (1995) Antibody Engineering (Breakthroughs in Molecular Biology), Oxford University Press; R. Kontermann & S. Diebel, editores (2001) Antibody Engineering (Springer Laboratory Manual), Springer Verlag). El fragmento de anticuerpo
 30 también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo como se describe en la patente U.S. n° 5.641.870. Tales fragmentos de anticuerpo lineal pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

También se contemplan variantes de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo descritos aquí, y se pueden obtener usando cualquiera de las técnicas y guías para mutaciones conservativas y no conservativas, por ejemplo
 35 la patente U.S. n° 5.364.934. Las variaciones incluyen sustitución, eliminación o inserción de uno o más codones que codifican el anticuerpo, que dan como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos en comparación con la secuencia nativa del anticuerpo. La utilidad de tales variaciones contempladas incluiría aquellas que conducen a (1) una reducción en la susceptibilidad a la proteólisis o inactivación por oxidación, (2) una alteración en la afinidad de unión para formar complejos proteicos o afinidades de unión a antígeno, (3) una alteración en el aclaramiento *in vivo* o biodistribución, (4) cambios en el isotipo o alotipo del anticuerpo, (5) cambios en las
 40 propiedades funcionales del anticuerpo, por ejemplo la unión al receptor de Fc, (6) una alteración en las secuencias epitópicas para disminuir o incrementar la inmunogenicidad, y (7) otros cambios en las propiedades fisicoquímicas o funcionales de tales análogos. Se puede encontrar una guía a la hora de determinar qué resto de aminoácido se puede insertar, sustituir o eliminar sin afectar de forma adversa a la actividad deseada minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos realizados en regiones de elevada homología entre los
 45 anticuerpos de RG1 y aquella de las proteínas homólogas. La variación permitida se puede determinar realizando sistemáticamente inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia, y ensayando las variantes resultantes en busca de la actividad mostrada por la secuencia nativa.

Un tipo particularmente preferido de variante sustitucional implica sustituir uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo progenitor (por ejemplo, anticuerpo humano). Generalmente, la variante o variantes
 50 resultantes seleccionadas para el desarrollo posterior tendrán propiedades biológicas mejoradas con respecto al anticuerpo progenitor a partir del que se generan. Una forma conveniente para generar tales variantes de sustitución implica maduración por afinidad usando presentación de fagos (Schier R., J. Mol. Biol., 263: 551-67, 1996). Las variantes se seleccionan entonces en busca de su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se describe aquí (véase el Ejemplo 4). A fin de identificar restos de la región hipervariable que serían buenos
 55 candidatos para la modificación, se puede llevar a cabo mutagénesis de barrido de alanina para identificar restos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes pueden continuar un desarrollo posterior.

La secuencia de aminoácidos de RG1 (SEC ID n°: 2) presentada en la presente memoria se puede utilizar para
 60 seleccionar regiones específicas del polipéptido RG1 para generar anticuerpos. Tal como comprenderán los expertos en la técnica, las regiones o epítomos de un polipéptido RG1 al que se dirige un anticuerpo pueden variar según la aplicación pretendida. Por ejemplo, los anticuerpos dirigidos a su utilización en un inmunoensayo para la detección de RG1 unido a membrana sobre células prostáticas se deben dirigir hacia epítomos accesibles en el

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, Garnier-Robson o Jameson-Wolf. Los fragmentos que contienen estos restos son particularmente adecuados para generar anticuerpos anti-RG1. Los fragmentos particularmente útiles incluyen, sin limitarse a, las secuencias PLGGESICSAGAPAKYSIT (SEC ID n°: 8); HSSDYSMWRKNQYVS (SEC ID n°: 10); DAGTDSGFTFSSPNFATIPQDTV (SEC ID n°: 11); y NEIVDSASVPET (SEC ID n°: 12). La generación de anticuerpos policlonales frente a dichas regiones se describe en el Ejemplo 4.

Uso de anticuerpos que reconocen epítopos de RG1

Los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos que se unen a antígeno, y sus variantes de la invención pueden ser particularmente útiles en ensayos de diagnóstico, metodologías por imagen y métodos terapéuticos para el manejo de cánceres en los que RG1 está sobreexpresado, incluyendo cánceres de la próstata, riñón, colon, y ovarios.

La invención da a conocer diversos ensayos inmunológicos útiles para la detección de polipéptidos RG1, y para la diagnosis de cánceres, tales como cáncer de próstata. Generalmente, dichos ensayos comprenden uno o más anticuerpos de RG1 capaces de reconocer y unirse a un polipéptido RG1. Los anticuerpos más preferidos se unirán selectivamente a RG1, y no se unirán (o lo harán débilmente) a polipéptidos no RG1. Los ensayos incluyen diversos formatos de ensayos inmunológicos bien conocidos en la técnica, incluyendo, sin limitarse a, diversos tipos de radioinmunoensayos, ensayos por inmovinoabsorción ligados a enzimas, y similares. Además, la presente invención también da a conocer métodos inmunológicos por imagen capaces de detectar cáncer de próstata, incluyendo, sin limitarse a, métodos de imagen radioescintigráficos que utilizan anticuerpos de RG1 marcados. Dichos ensayos pueden ser clínicamente útiles en la detección, monitorización y pronóstico de cánceres, tales como 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 de RG1 para aislar células positivas a RG1 utilizando técnicas de clasificación y purificación celulares. Particularmente, los anticuerpos de RG1 se pueden utilizar para aislar células de cáncer de próstata procedentes de tejido tumoral de xenotransplante, procedentes de células en cultivo, etc., utilizando técnicas de clasificación celular basada en anticuerpos o de purificación por afinidad. Otros usos de los anticuerpos de RG1 de la invención incluyen generar anticuerpos antiidiotípicos que imitan el polipéptido RG1.

Los anticuerpos de RG1 pueden ser utilizados para detectar la presencia de cáncer de próstata o metástasis tumoral. La presencia de tales células que contienen RG1 en diversas muestras biológicas, incluyendo suero, próstata y otros especímenes de biopsia de tejido, puede ser detectada con anticuerpos de RG1. Además, los anticuerpos de RG1 pueden ser utilizados en diversas metodologías de imagen, tales como inmunoescintigrafía con anticuerpo conjugados a ^{99m}Tc (u otro isótopo). Por ejemplo, se puede utilizar un protocolo de análisis por imagen similar al descrito recientemente que usa un anticuerpo anti-PSMA conjugado a ¹¹¹In para detectar carcinomas de próstata recurrentes y metastáticos (Sodee et al, Clin. Nuc. Med. 21: 759-766, 1997). Otro método de detección que se puede usar es la tomografía de emisión positrónica (véase Herzog et al., J. Nucl. Med. 34:2222-2226, 1993).

Los anticuerpos de RG1 de la invención se pueden marcar con un marcador detectable, o se pueden conjugar a una segunda molécula, tal como un agente citotóxico, y pueden 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, ricina, doxorubicina, daunorubicina, taxol, bromuro de etidio, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colquicina, dihidroxiantracindiona, actinomicina D, toxina diftérica, epotilonas, exotoxina de Pseudomonas (PE) A, PE40, abrina, glucocorticoide y otros agentes quimioterapéuticos, así como radioisótopos. Se pueden crear proteínas de fusión citotóxicas o antiproliferativas dirigidas a dianas mediante fusión genética o química del anticuerpo a una citosina, quimiocina, interferón, o factor de crecimiento apropiado que tiene la actividad biológica antitumoral deseada (Asgeirsdottir et al., Blochem. Pharmacol. 15:1729-1739, 2003). Los marcadores detectables adecuados incluyen, sin limitarse a, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un quelante metálico o una enzima. Los radioisótopos adecuados para inmunoterapia o para uso como un marcador detectable incluyen los siguientes: antimonio-124, antimonio-125, arsénico-74, bario-103, bario-140, berilio-7, bismuto-206, 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-2226, renio-186, rubidio-86, rutenio-103, rutenio-106, escandio-44, escandio-46, selenio-75, plata-110m, plata 11, 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, volframio-185, vanadio-48, vanadio-49, iterbio-169, itrio-88, itrio-90, zinc-65 y zirconio-95.

El radiomarcado de los anticuerpos se logra usando un agente quelante que se une covalentemente al anticuerpo, con el radionúclido insertado en el agente quelante. Los agentes quelantes preferidos se exponen en Srivagava et al. Nucl. Med. Bio. 18:589-603, 1991 y McMurry et al., J. Med. Chem. 41:3546-3549, 1998, o se derivan a partir del denominado quelato de NOTA publicado en H. Chong, K et al., J. Med. Chem. 45:3458-3464, 2002. Se prefieren particularmente para la conjugación de radioisótopos a un anticuerpo de RG1 los derivados del quelador bifuncional p-SCN-bencil-DTPA (Brechtel et al. Inorg. Chem. 25:2772-2781, 1986); Por ejemplo, ciclohexil-DTPA (CHX-Aⁿ-DTPA, Wu et al., Bioorg. Med. Chem. 10:1925-1934, 1997) y MXDTPA (1B4M-DTPA, McMurry et al., J. Med. Chem., 41: 3546-3549, 1998), así como ácido 1,4,7-triazaciclono-nano-N,N',N''-triacético (NOTA) (Chong et al. J. Med. Chem. 45:3458-3464, 2002). La conjugación se puede lograr mediante el método de Nikula et al. Nucl. Med. Biol. 3:387-390, 1995. Se prefieren particularmente para uso como un marcador detectable para inmunoscintigrafía los isótopos ¹¹¹In o ^{99m}Tc. Los marcadores detectables preferidos para tomografía de emisión positrónica son ⁴³Sc, ⁴⁴Sc, ⁵²Fe, ⁵⁵Co, ⁶⁸Ga, ⁶⁴Cu, ⁸⁶Y y ^{94m}Tc. Para inmunoterapia, se pueden usar los radioisótopos que emiten radiación beta, ⁴⁶Sc, ⁴⁷Sc, ⁴⁸Sc, ⁷²Ga, ⁷³Ga, ⁹⁰Y, ⁶⁷Cu, ¹⁰⁹Pd, ¹¹¹Ag, ¹⁴⁹Pm, ¹⁵³Sm, ¹⁶⁶Ho, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re, y ¹⁸⁸Re, y los isótopos que emiten radiación alfa, ²¹¹At, ²¹¹Bi, ²¹²Bi, ²¹³Bi y ²¹⁴Bi. Se prefieren ⁹⁰Y, ¹⁷⁷Lu, ⁷²Ga, ¹⁵³Sm, ⁶⁷Cu y ²¹²Bi, y se prefieren particularmente ⁹⁰Y y ¹⁷⁷Lu.

Inmunoterapia para cáncer de próstata

La invención proporciona diversos inmunoconjugados para uso para tratar cáncer de próstata y otros cánceres, incluyendo los enfoques de terapia con anticuerpos, vacunas *in vivo* e inmunoterapia *ex vivo*. Otros cánceres incluyen cáncer del riñón, colon, y ovarios. En un enfoque, la invención proporciona anticuerpos de RG1 que se pueden utilizar para tratar cáncer de próstata. Por ejemplo, se pueden usar anticuerpos RG1 no conjugados de tal modo que dicho anticuerpo se una a RG1 presente sobre las células de cáncer de próstata, en las mismas o asociado a las mismas, y medie la destrucción de las células, y el tumor, por 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 unión a ligando o transducción de señales. Los anticuerpos de RG1 conjugados a agentes tóxicos tales como ricina o radioisótopos, como se describen anteriormente, también se pueden utilizar terapéuticamente para suministrar el agente tóxico directamente a las células tumorales de próstata que poseen RG1, y de este modo destruir las células tumorales.

La inmunoterapia del cáncer de próstata utilizando anticuerpos de RG1 puede seguir las enseñanzas generadas por diversos enfoques que se han utilizado con éxito con respecto a otros tipos de cáncer, incluyendo, sin limitarse a, 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 mama (Shepard et al, J. Clin. Immunol. 11: 117-127, 1991).

Se describen aquí vacunas formuladas para contener un polipéptido 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 inmunógenos 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.

Se pueden utilizar sistemas de suministro génico virales para suministrar una molécula de ácido nucleico que codifica RG1. Diversos sistemas de suministro génico virales que se pueden utilizar en la práctica de este aspecto de la invención incluyen, sin limitarse a, virus de la vacuna, virus de la gripe aviar, virus de la viruela del canario, adenovirus, virus de la gripe, poliovirus, virus adenoasociado, lentivirus y virus Sindbus (Restifo, en Curr. Opin. Immunol. 8: 658-663, 1996). También se pueden emplear sistemas de suministro no virales utilizando ADN desnudo que codifica un polipéptido RG1 o un fragmento del mismo introducido en el paciente (es decir, intramuscularmente) para inducir una respuesta antitumoral. Se puede emplear el ADNc de *rg1* humano de longitud completa. En otra realización, se pueden emplear fragmentos de ADNc de *rg1* humano. Se pueden utilizar moléculas de ácido nucleico de *rg1* que codifican epítopos de linfocitos T específicos (CTL). Los epítopos de CTL se pueden determinar utilizando algoritmos específicos (por ejemplo, Epimer, Brown University) para identificar péptidos dentro de un polipéptido RG1 que son capaces de unirse óptimamente a alelos HLA especificados.

También se pueden emplear diversas estrategias *ex vivo*. Un enfoque comprende la utilización de células dendríticas a efectos de presentar un polipéptido RG1 como antígeno al sistema inmunitario 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 pulsadas con péptidos del antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) en un ensayo clínico en fase I para estimular los sistemas inmunitarios de los pacientes con cáncer de próstata (Tjoo 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. Las células dendríticas autólogas se pueden pulsar con polipéptidos RG1 capaces de unirse a moléculas de MHC, o se pueden

pulsar con el polipéptido RG1 completo. Las células dendríticas también se pueden manipular mediante ingeniería para sobreexpresar el gen *rg1* 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 una vacuna para inducir una respuesta inmunitaria a las células que expresan el polipéptido RG1. Específicamente, la generación de anticuerpos antiidiotípicos es bien conocida en la técnica, y se puede adaptar fácilmente para 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 emplear métodos de inmunización genética para generar respuestas inmunitarias 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 codifica un polipéptido/inmunógeno 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/inmunógeno RG1 codificado. El polipéptido/inmunógeno RG1 se puede expresar como un polipéptido de superficie celular o se puede segregar. La expresión del polipéptido/inmunógeno 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 profilácticas y terapéuticas conocidas en la técnica (para una visión general, véase la información y referencias publicadas en la dirección de Internet www.genweb.com).

Ensayos para la identificación de agentes que se unen a RG1

Se describen aquí ensayos y métodos que pueden ser utilizados para identificar agentes (es decir, un anticuerpo, péptido, etc.) que se unen a RG1. Específicamente, se pueden identificar agentes que se unen a RG1 mediante la capacidad del ligando RG1 o de otro agente o constituyente para unirse a RG1 y/o la capacidad de inhibir/estimular la actividad de 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 destinadas a ser seleccionadas como dianas por los anticuerpos. Dichos agentes se pueden utilizar en estudios de unión competitiva para identificar agentes inhibidores de segunda generación, así como para bloquear la actividad de RG1.

Los agentes que se unen a un polipéptido RG1, tales como un anticuerpo de 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 utilizadas como diana o identificadas utilizando un agente que se une a RG1.

El modo como se utilicen los agentes de unión a RG1 dependerá de la naturaleza del agente de unión a RG1. Por ejemplo, un agente de unión a RG1 se puede utilizar para: suministrar toxinas conjugadas, tales como toxina de difteria, toxina de cólera, exotoxina de ricina o pseudomonas, a una célula que expresa RG1; modular la actividad de RG1; exterminar directamente una célula que expresa RG1; o en cribados, para identificar agentes de unión competitivos. Por ejemplo, se puede utilizar un agente inhibidor de RG1 para inhibir directamente el crecimiento de las células que expresan RG1, mientras que se puede utilizar un agente de unión a RG1 como agente de diagnóstico.

Composiciones farmacéuticas y administración

Se describen aquí composiciones farmacéuticas que pueden comprender polinucleótidos *rg1*, polipéptidos RG1, anticuerpos, agonistas, antagonistas o inhibidores, solos o en combinación con por lo menos otro agente, tal como un compuesto estabilizante, que puede ser administrado mediante cualquier vehículo farmacéutico biocompatible estéril, incluyendo, sin limitarse a los mismos, disolución salina, disolución salina tamponada, dextrosa 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 vehículos farmacéuticamente aceptables. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser farmacéuticamente inerte.

La administración de las composiciones farmacéuticas se puede lograr oral o parenteralmente. Los métodos de suministro 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 vehículos adecuados farmacéuticamente aceptables que comprenden excipientes y sustancias auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden ser utilizadas farmacéuticamente. Se pueden encontrar

detalles adicionales sobre las técnicas para la formulación y administración en la última edición de Remington's Pharmaceutical Sciences (Ed. Maack Publishing Co, Easton, Pa.).

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

10 Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener mediante una combinación de compuestos activos con un excipiente sólido, triturando opcionalmente la mezcla resultante, y procesando dicha mezcla de gránulos, tras añadir sustancias auxiliares adecuadas, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Son recipientes adecuados las cargas 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 proteínas, tales como gelatina y colágeno. Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes o solubilizantes, tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar, ácido algínico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio.

20 Los núcleos de grageas se proporcionan con revestimientos adecuados, tales como disoluciones concentradas de azúcar, que también pueden contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, disoluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir materias colorantes o pigmentos a los revestimientos de comprimidos o grageas para la identificación del producto o para caracterizar la cantidad de compuesto activo, es decir, la dosificación.

25 Las preparaciones farmacéuticas que se pueden utilizar oralmente incluyen cápsulas duras realizadas en gelatina, así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina, y un revestimiento tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener ingredientes activos mezclados con una carga o 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.

30 Las formulaciones farmacéuticas para la administración parenteral incluyen disoluciones acuosas de compuestos activos. Para la inyección, las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden formular en disoluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como disolución de Hank, disolución de Ringer o disolución salina fisiológicamente tamponada. Las suspensiones acuosas de inyección pueden contener 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 lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales 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 para permitir la preparación de disoluciones altamente concentradas.

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

40 Kits

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

50 Las composiciones farmacéuticas descritas aquí se pueden fabricar de un modo conocido en la técnica, por ejemplo mediante procedimientos convencionales de mezclamiento, disolución, granulación, obtención de grageas, levigación, emulsionamiento, encapsulamiento, atrapamiento o liofilización.

55 La composición farmacéutica se puede proporcionar en forma de sal, y se puede formar con muchos ácidos, incluyendo, sin limitarse a, 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 formas de base libre correspondientes. En otros casos, la preparación preferente puede ser un polvo liofilizado en histidina 1 mM-50 mM, 0,1%-2% de sacarosa, 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 de la invención

formuladas en un vehículo aceptable, las mismas se pueden introducir en un recipiente adecuado y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada. Para la administración de RG1, dicho etiquetado incluirá la cantidad, la frecuencia y el método de administración.

Dosis terapéuticamente eficaz

5 Las composiciones farmacéuticas incluyen composiciones en las que los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para alcanzar el fin pretendido, es decir, el tratamiento de un estado mórbido particular caracterizado por la expresión de RG1. La determinación de una dosis eficaz resultará evidente para un experto en la técnica.

10 Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz 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 para determinar dosis útiles y vías para la administración a seres humanos.

15 Una dosis terapéuticamente eficaz 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, ED₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos terapéutico y tóxico es el índice terapéutico, y se puede expresar como la relación ED₅₀/LD₅₀. 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 humano. La dosificación de dichos compuestos está comprendida preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen el ED₅₀ 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.

25 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 para proporcionar niveles suficientes del resto activo, o para mantener el efecto deseado. Otros factores que se pueden tener en cuenta incluyen la gravedad del estado mórbido, 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 semivida y la velocidad de aclaramiento de la formulación en particular.

35 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 n° 4.657.760; n° 5.206.344; o n° 5.225.212. Los expertos en la técnica utilizan diferentes formulaciones para los polinucleótidos que para las proteínas o sus inhibidores. De forma similar, el suministro de polinucleótidos o polipéptidos será específico para células, condiciones, localizaciones particulares, etc. Las actividades específicas preferidas para un anticuerpo radiomarcado pueden oscilar desde 0,1 a 10 mCi/mg de proteína (Riva et al., Clin. Cancer Res. 5:3275s-3280s, 1999; Wong et al., Clin. Cancer Res. 6: 3855-3863, 2000; Wagner et al., J. Nuclear Med. 43:267-272, 2002).

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

50 Todos los ejemplos se llevaron a cabo utilizando técnicas estándares, bien conocidas y rutinarias para los expertos en la técnica, excepto donde se describe de otro modo 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

55 *Rg1* se identificó como un gen expresado en la próstata explorando la base de datos de Incyte LifeSeq®. La secuencia nucleotídica se identificó 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 nucleotídica se encontró en la categoría de moléculas de adhesión celular en la base de datos anotada, y fue descrita como un homólogo de F-espondina. El análisis Northern electrónico de la distribución de secuencias de polinucleótidos *rg1* en el conjunto de bibliotecas de la base de datos reveló que *rg1* se expresó en niveles elevados en las bibliotecas prostáticas y en niveles más bajos en cierto número de otras bibliotecas de

tejidos, incluyendo las de tejidos normales y tumorales.

Tras el ensamblaje del conjunto de clones *rg1* de la base de datos en una secuencia polinucleotídica contigua, y la edición de la secuencia contigua, se identificó una secuencia codificante de longitud completa en el polinucleótido ensamblado predicho. Dicha secuencia codificaba una proteína homóloga a F-espondina y a Mindina-2.

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

EJEMPLO 2: Expresión de ARNm de *rg1*

- 10 La expresión de ARNm de *rg1* en una variedad de muestras de tejidos normales y tumorales, y en estirpes 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 modificado de Gleason 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
15 tejidos tumorales y normales a través de fuentes comerciales, incluyendo Clonetech y Biochain. Se obtuvieron estirpes 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 estirpes celulares se establecieron en ratones atímicos y se recolectaron de dichos ratones aproximadamente 4-6 semanas tras la implantación. Se aisló ARN a partir de los tumores mediante
20 procedimientos estándar.

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).

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

EJEMPLO 3: Clonación y expresión de RG1 en células BHK

- 30 Clonación: La región codificante de RG1 se obtuvo a partir del plásmido 3360733 de Incyte. La secuencia codificante se amplificó por PCR con los cebadores SST115 (5'-TCCCTCTAGAGCCACCATGGAAAACCCCAGCCCGGC-3') (SEC ID n°: 6) y SST113 (5'-AAGGCATCACGTGTTAGACGCAGTTATCAGGGACG-3') (SEC ID n°: 7) en una reacción PCR estándar (100 ul) utilizando tampón de polimerasa 1x Pfu Turbo (Stratagene, La Jolla, CA)/200 uM dNTPs/0,2 uM cebadores oligonucleotídicos/ 2,5 U Pfu Turbo polimerasa (Stratagene). Las condiciones de amplificación por PCR fueron las
35 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 para obtener un fragmento de 1010 pb que se purificó en un gel de agarosa al 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 ug/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 codificante de RG1 insertada.
45 Este plásmido se denominó pPEG6.

- Expresión: Se utilizaron dos microgramos de pPEG6 para transfectar $1-3 \times 10^5$ células renales de cría de 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 dividieron 1 a 10 y se inició la selección para las células
50 que contenían el plásmido mediante adición de puromicina (2,5 ug/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 células se lavaron con PBS, se dividieron 1 a 10, se añadió medio DMEM con suero y se añadieron 5 ug/ml de puromicina. Tras 2-3 días adicionales, el medio se sustituyó por DMEM y 5 ug/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 de
55 RG1. La proteína RG1 se detectó en un nivel de 1 ug/ml.

Purificación: Células de riñón de cría de hámster (BHK), transfectadas para sobreexpresar de forma estable y segregar la proteína RG1 en el medio de crecimiento, se cultivaron en medio que contiene suero fetal bovino. Cuando fueron subconfluentes, las células se cambiaron a medio libre de suero durante 24-48 horas. El medio se

recogió, se centrifugó para eliminar células, y se almacenó a -80 grados C. El medio se descongeló inmediatamente antes de la purificación y se mantuvo en hielo. Se añadieron inhibidores de proteasas, el medio se diluyó diez veces con tampón frío de acetato de sodio 20 mM, pH 6,5, y se mantuvo a 4 grados C durante la purificación. La muestra diluida se cargó en una columna de intercambio aniónico Q-Sepharose a un caudal de 0,5 ml/min., y después se lavó con el mismo tampón. La elución se llevó a cabo usando un gradiente lineal de NaCl (0-80% de NaCl 1 M en tampón, 0,5% por minuto) mientras se recogían las fracciones. La RG1 eluyó a aproximadamente NaCl 75 mM, como se determina mediante SDS PAGE y transferencia Western. Las fracciones que contienen RG1 se reunieron, se concentraron mediante ultrafiltración, y se purificaron adicionalmente sobre una columna de filtración en gel Superdex 75. Se usó BHK-RG1 purificada como inmunógeno en la generación de mAbs humanos que son específicos para la proteína RG1 nativa (nRG1), y como antígeno en la identificación y caracterización de estos anticuerpos.

EJEMPLO 4: Generación de anticuerpos

Anticuerpos policlonales: 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 predichas en la superficie de la proteína, a fin de generar antisueros que reconozcan con mayor probabilidad epítopos de superficie. Los restos de cisteína se sustituyeron por ácido aminobutírico (Abu) para 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.

Designación	Posición	Secuencia de aminoácidos
1C	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 seroalbúmina bovina (BSA) para el análisis de titulaciones de antisuero a través de ELISA.

Se inmunizaron dos animales con 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 los títulos de anticuerpos contra el conjugado específico de BSA-péptido 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.

Anticuerpos monoclonales: Se generaron anticuerpos monoclonales 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 identificación por ELISA para hibridomas que producían anticuerpos dirigidos contra los péptidos y la proteína RG1.

También se prepararon anticuerpos monoclonales humanos con especificidad por RG1 nativa mediante inmunización de ratones transgénicos que contienen locis de las cadenas ligeras kappa de ratón y cadenas pesadas de ratón destruidos. (Patente U.S. nº 5.877.397). Los ratones transgénicos procedentes de razas endogámicas C57BL/6J (Medarex) se inmunizaron con proteína RG1 purificada producida en una estirpe celular BHK transfectada, estable (véase el Ejemplo 3).

El antígeno se mezcló con adyuvante completo de Freund (Sigma, F5881) para la primera y segunda inmunización para protocolo uno; después, los antígenos se mezclaron con Freund incompleto (Sigma, F5506). Para el segundo protocolo, se usó Freund completo para la primera inmunización, y después se usó Freund incompleto. Cada ratón recibió 25 µg de RG1 nativa (nRG1) en 100 µl de PBS, se mezcló 1:1 con el adyuvante usando una aguja emulsionadora. A los ratones se les inyectó con 0,2 ml de antígeno preparado, en la cavidad peritoneal.

Preparación de hibridoma: Para las fusiones, se usó la estirpe celular de mieloma P3 X63 ag8.653 (ATCC CRL 1580, lote F-15183). El vial de ATCC original se descongeló y se expandió en cultivo. A partir de esta expansión, se

preparó un lote de siembra de viales congelados. Las células se mantuvieron en cultivo durante 3-6 meses, haciéndose pasar dos veces a la semana. El sobrenadante procedente de células P388D1 (ATCC, TIB-63 FL) se usó como medio acondicionado para los hibridomas. De forma breve, las células se hicieron crecer y se expandieron hasta 200 ml. Los cultivos estacionarios se hicieron crecer durante ~7 días. El sobrenadante exhausto se hizo girar y se filtró a través de un filtro estéril de 0,2 μm . Esta estirpe celular se hizo pasar durante 3-6 meses, y después se descongeló un nuevo vial.

Para cultivar las células de mieloma y las células P388D1, se usó DMEM (Cellgro# 10013271, 10013270) que contiene 5% de FBS (Hyclone, #AKE11828), y P/S (Cellgro, #30002029). Al medio de crecimiento del hibridoma se añadieron suplementos adicionales de medios, que incluyeron 5% de Origen - Hybridoma Cloning Factor (IGEN, # 36684, 36908), 5% de medio acondicionado de P388D1 (11/15/00, 12/21/00 DH), 10% de FCS (Hyclone, #AKE11828), β -mercaptoetanol (Gibco #1076640), geneticina (Gibco #1079874), Hepes (Cellgro-#25060041) y HAT (Sigma, H 0262; $1,0 \times 10^{-4}$ M de hipoxantina, $4,0 \times 10^{-7}$ M de aminopterina, $1,6 \times 10^{-5}$ M de timidina), o HT (Sigma, H0137; $1,0 \times 10^{-4}$ M de hipoxantina, $1,6 \times 10^{-5}$ M de timidina).

Los esplenocitos se fusionaron con células de mieloma usando PEG y metodología estándar. Los hibridomas resultantes se colocaron en 50 placas de 96 pocillos, se sembraron a 200 μl /pocillo para la primera fusión. La identificación inicial mediante ELISA para anticuerpos IgG, κ humanos se realizó 10-12 días tras la fusión. Los pocillos positivos a IgG, κ humano se identificaron entonces mediante un ELISA de captura con 6-His. Esta identificación condujo al aislamiento de 8 anticuerpos humanos procedentes de 3 fusiones: tres anticuerpos de la subclase IgM, un anticuerpo de la subclase IgG3, y cuatro anticuerpos de la subclase IgG1.

Los hibridomas de pocillos con anticuerpos que se unen a antígeno se transfirieron en primer lugar a placas de 24 pocillos, y se volvieron a identificar nuevamente en busca de la especificidad. Los hibridomas específicos de RG1 nativa se subclonaron mediante dilución limitante para asegurar la monoclonalidad. Los hibridomas que producen anticuerpos que se unen a RG1 nativa (nRG1) se conservaron en varias etapas en el proceso de desarrollo al congelar células en medio de congelación IGEN. El medio procedente de estas estirpes se congeló y se usó para la purificación de anticuerpos como se describe más abajo. Se determinó que cuatro de los ocho tienen especificidad suficiente para garantizar un estudio adicional.

Purificación de anticuerpos: Cuatro de los anticuerpos monoclonales humanos contra RG1 descritos anteriormente se purificaron a partir de medio acondicionado celular usando cromatografía de afinidad con Proteína G Sefarosa. Las células se retiraron del medio mediante centrifugación y filtración, el medio se hizo pasar sobre la columna de Proteína G. La columna se lavó entonces en PBS para eliminar material no unido. Los anticuerpos unidos se eluyeron con 100 mM de glicina, pH 2,5, y se neutralizaron inmediatamente añadiendo 10% v/v de Tris 1 M, pH 8, a las fracciones. Las fracciones que contienen anticuerpo se reunieron, se dializaron en PBS, se ensayaron para determinar la pureza mediante SDS PAGE, y se evaluaron para determinar la actividad de unión a antígeno mediante ELISA.

Identificación de anticuerpos: La identificación de anticuerpos se llevó a cabo usando varios procedimientos de ensayo diferentes:

A. Identificación mediante ELISA de hIgG $\gamma\kappa$: Placas de microtitulación de noventiseis pocillos (Falcon, #3912) se revistieron toda la noche con 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anti-IgG κ humana o anti-IgG κ humana en PBS (50 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$). Las placas se aspiraron y bloquearon con PBS 0,05% de Tween 20 que contiene 5% de suero de pollo durante 1 hora a temperatura ambiente (100 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$), y después se lavaron tres veces con PBS-Tween. Los sobrenadantes de hibridoma se diluyeron 1:2 en tampón de bloqueo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente (100 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$) para la identificación. Tras la incubación, las placas se lavaron tres veces en tampón de bloqueo antes de añadir 100 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ de anticuerpo secundario (anti-IgGFc humano con HRP (Jackson, #109-036-098 o anti-IgG κ humana con HRP (Sigma, #A-7164). El anticuerpo secundario se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, y después las placas se lavaron 2X en tampón de bloqueo. Las placas se desarrollaron usando 10 ml de tampón de fosfato y citrato, pH 4,0, que contiene 80 μl de ABTS (Sigma, #A1888), 8 μl de H_2O_2 por placa, y se leyeron a $A_{415-490}$ nm.

B. ELISA de unión a RG1: Se revistieron placas de microtitulación de noventiseis pocillos toda la noche con 0,5-1,0 $\mu\text{g}/\text{pocillo}$ de proteína RG1 nativa purificada en PBS, 50 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$, 4 grados C. Las placas se aspiraron, y entonces la reacción se bloqueó con la adición de 100 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ de PBS-Tween + 5% de suero de pollo, seguido de la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron entonces 3 veces en tampón de bloqueo. Entonces se añadieron a cada pocillo, a 50 $\mu\text{l}/\text{pocillo}$, muestras diluidas en serie (suero, sobrenadante de hibridoma, mAbs purificados, etc.). Incúbese 1 hora a temperatura ambiente, y después lávese 3 veces en tampón de bloqueo. Los pocillos se incubaron entonces con anticuerpo secundario anti-IgGFc humano con HRP en tampón de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente, y después se lavaron 3 veces como antes. Las placas se desarrollaron usando sustrato descrito anteriormente, y se midieron a A_{405} usando un lector de placas de 96 pocillos.

C. Método de ELISA de captura: A fin de determinar la unión de mAb a la proteína RG1 en su conformación nativa, se usó un formato de ELISA de captura. La proteína RG1, que contiene una etiqueta de expresión de

seis histidinas (6His-RG1), se expresó en células BHK y se usó como el antígeno. La 6His-RG1 se purificó del medio acondicionado usando cromatografía de afinidad con NiNTA agarosa, siguiendo metodología estándar.

5 6HisRG1 purificada se capturó en placas de NiNTA de 96 pocillos (Qiagen NiNTA HisSorb) usando una concentración de 1,5 ug/ml en PBS más 0,2% de BSA (PBS/BSA, 100 ul/pocillo) toda la noche a 4 grados C. Los pocillos se lavaron 3 veces con PBS que contiene 0,05% de Tween 20 (PBST). Las muestras (sobrenadante de hibridoma, sueros, mAbs purificados, etc.) se diluyeron en PBS/BSA y se incubaron en placas durante 1-2 horas a temperatura ambiente (50 ul/pocillo), y después se lavaron 3 veces con PBST. El anticuerpo secundario (anti-IgGFc humano de cabra marcado con HRP) se diluyó 1:5000 en PBS/BSA, se añadió a la placa de 50 ul/pocillo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.

10 Las placas se lavaron 3 veces con PBST y se desarrollaron como en un ELISA. La absorbancia a 405 nm se midió usando un lector de placas de ELISA.

15 D. Ensayo de resonancia de plasmones de superficie (SPR) de BIAcore: Los sobrenadantes de hibridoma progenitores se identificaron adicionalmente para clasificar cualitativamente clones mediante avidéz usando SPR. Se inmovilizó anti-IgGFc humano de conejo (Pierce, 31142) sobre el chip sensor (Biacore, BR-1000-12) usando acoplamiento amínico estándar y 60 ug/ml de anticuerpo en acetato pH 4,0, y una fase móvil de disolución salina tamponada con HEPES (HBS). El medio de hibridoma se hizo pasar sobre la superficie a 5 ul/min. para su captura sobre la superficie, y después se lavó hasta la línea base con HBS. La proteína BHK-RG1 nativa purificada (400 nM) se hizo pasar entonces sobre la superficie, y se midió la unión mediante SPR. Al final de la inyección, se hizo pasar HBS sobre la superficie, para medir la disociación del complejo anticuerpo:RG1. La pendiente de la medida de SPR a lo largo del tiempo es indicativa de la velocidad de disociación: cuanto mayor es la pendiente, más rápida es la velocidad de disociación, y por lo tanto menor es la avidéz del anticuerpo.

EJEMPLO 5: Análisis de transferencia Western de anticuerpos

25 Se analizaron antisueros por transferencia Western para determinar su especificidad a RG1. Los antisueros específicos de RG1 (los que reaccionan contra las secuencias 1C y 3C, anteriormente) se ensayaron en RG1 expresado transitoriamente en células COS, RG1 nativo secretado a partir de células LNCaP, y RG1 producido a partir de células renales de cría de hámster (BHK) transfectadas. Se ensayaron además antisueros específicos de RG1 en 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 ul de cada lisado en un gel de SDS-poliacrilamida al 12% para resolver las proteínas. A continuación, las proteínas resueltas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. La especificidad de la unión de los anticuerpos de RG1 se verificó por unión en presencia de los péptidos homólogos y heterólogos. Los antisueros específicos de RG1 pudieron detectar la proteína en todas las muestras menos en células PC-3 y tumores PC-3.

El análisis de transferencia Western de mAbs humanos, específicos para RG1 nativa, demostró que estos anticuerpos reconocen RG1 en transferencias sólo en condiciones no reductoras. Esto sugirió que estos mAbs se unen a una forma más nativa de RG1.

EJEMPLO 6: Purificación de proteína RG1 nativa segregada a partir de células LNCaP

40 Se puso de manifiesto por análisis de transferencia Western que las células LNCaP reproducidas en cultivo segregan proteína RG1 nativa. A fin 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 transferencia Western y SDS PAGE. La proteína RG1 nativa corre 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.

50 EJEMPLO 7: Tinción inmunohistoquímica de expresión de RG1 en cáncer de próstata y metástasis de cáncer de próstata

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, así como ganglios linfáticos y metástasis ósea. Se obtuvieron tejidos prostáticos adicionales del Departamento de Urología de la Stanford University School de Stanford, y se analizaron en Berlex. Las secciones tisulares 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.

Se examinó la expresión de RG1 en tejido tumor de próstata y en tejido de próstata normal procedentes de varios pacientes. En todos los casos, se observó una fuerte tinción, que representa la expresión de RG-1, en las muestras de tumor de próstata. La expresión de RG-1 varió en el tejido de próstata normal, desde casi ninguna hasta una tinción significativa.

- 5 La expresión de RG1 también se detectó mediante inmunohistoquímica en ganglios linfáticos y muestras óseas que se sabe que contienen metástasis de tumor de próstata. El ganglio linfático o hueso normal no muestran tinción.

Ejemplo 8: Secuenciación de anticuerpos de RG1

10 Las secuencia de ácidos nucleicos de dos anticuerpos de RG1 humanos (C y B) generados y purificados como se describe anteriormente en el Ejemplo 4 se determinaron mediante métodos estándar. La secuencia nucleotídica de la región variable de la cadena ligera B se designa SEC ID NO: 20, y la de la región variable de cadena pesada B es SEC ID NO: 21. La secuencia nucleotídica de la región variable de cadena ligera C se designa SEC ID NO: 23, y la de la región variable de cadena pesada C es SEC ID NO: 24.

15 Se determinaron las secuencias de aminoácidos predichas correspondientes de estas regiones de cadena variable, y se designan SEC ID NO: 26 (cadena ligera B); SEC ID NO: 27(cadena pesada B); SEC ID NO: 29(cadena ligera C); SEC ID NO: 30(cadena pesada C). Véanse las Figuras 3 y 4.

Ejemplo 9: Determinación de las constantes de unión para anticuerpos de RG1

20 Las constantes cinéticas (K_D , k_a y k_d) de la unión de mAb a proteína RG1 nativa se determinaron mediante BIAcore usando un formato de captura en el que la proteína RG1 nativa soluble se unió a mAb inmovilizado sobre un chip sensor. Se inmovilizó covalentemente anti-IgGFc humano de conejo ImmunoPure (Pierce, 31142) al Chip Sensor CM5 (Biacore, BR-1000-12) usando métodos de acoplamiento amínico estándar. Se usaron 100 ug/ml de anticuerpo, diluido en 10 mM de acetato, pH 4,0, a 5 ul/min. Como fase móvil, se usó HBS-EP (Biacore, BR-1001-88). Los sitios sin reaccionar se bloquearon con etanolamina. Los mAbs se diluyeron hasta 200 nM con HBS, y se inyectaron 50 ul por ciclo a 10 ul/min. Diluciones en serie de BHK-RG1 (12,5-400 nM) se unieron al mAb inmovilizado. Las cinéticas de disociación se midieron inmediatamente después de que se terminó la inyección del antígeno a 20 ul/min. durante 8 minutos. La superficie se regeneró después de cada ciclo usando 25 ul de 10 mM de glicina, pH 1,8, y después se lavó con HBS.

25 Típicamente, se ejecutaron cinco concentraciones y un control de medio. Los datos se ajustaron a un modelo de Langmuir 1:1 usando el software proporcionado por el fabricante de instrumento (BIAevaluation 3.0), y se calcularon las constantes cinéticas. Las constantes en el equilibrio estuvieron en el intervalo nanomolar con velocidades de disociación favorables (10^{-4} s⁻¹). La Tabla 1 muestra las constantes cinéticas para 4 de los anticuerpos humanos.

35 Tabla 1: Constantes cinéticas de los anticuerpos de RG-1 humanos A, B, C, y D. Las constantes cinéticas para estos anticuerpos se determinaron ajustando un modelo de Langmuir 1:1 a los datos obtenidos del estudio de BIAcore. K_a : velocidad de asociación (1/s); k_d : velocidad de disociación (1/s), K_D : afinidad (M)

mAb	K_a (1/M s)	K_d (1/s)	K_D (M)
A	$2,3 \times 10^4$	$1,9 \times 10^{-4}$	$8,9 \times 10^{-9}$
B	$2,9 \times 10^4$	$2,3 \times 10^{-4}$	$8,4 \times 10^{-9}$
C	$2,5 \times 10^4$	$8,4 \times 10^{-4}$	$3,36 \times 10^{-8}$
D	$3,17 \times 10^4$	$2,95 \times 10^{-3}$	$9,27 \times 10^{-8}$

Ejemplo 10: Radiomarcado de anticuerpos de RG1

40 Conjugación de quelador a anticuerpos de RG1: El quelador bifuncional p-SCN-bencil-DTPA (Macrocyclics, Inc.) se unió covalentemente a anticuerpos usando un método adaptado de Nikula et al, Nucl. Med. Biol., Vol. 22, No. 3, p. 387-390, 1995. Todos los reactivos y equipo utilizados durante este procedimiento se hicieron libres de metal antes del uso, a fin de evitar la inactivación del quelador. Todas las disoluciones se prepararon con reactivos con poco contenido en metal, agua de pureza elevada (MilliQ) y Chelex tratado para eliminar metales en trazas. Todo el equipo se aclaró con 10 mM de EDTA, y después se aclaró intensamente con agua MilliQ.

45 Los mAbs purificados (~20 mg) se trataron en primer lugar con 1 mM de EDTA durante 1 hora a temperatura ambiente para eliminar cualesquiera metales antes del intercambio del tampón en tampón de carbonato 50 mM, NaCl 150 mM, pH 8,5 usando una columna de desalación Pharmacia 26/10 en un sistema de cromatografía AKTA. Las fracciones que contienen los anticuerpos se reunieron y se concentraron hasta aproximadamente 2 mg/ml mediante ultrafiltración (Centricon 30). Se preparó recientemente una disolución madre de p-SCN-bencil-DTPA 100

mg/ml en DMSO anhidro. En la reacción de conjugación, que se dejó transcurrir toda la noche a temperatura ambiente se usó un exceso molar de 50-100 veces de DTPA. La mezcla de reacción se intercambió entonces de tampón en acetato de Na 50 mM, NaCl 150 mM, pH 6,5 (tampón de radiomarcado), y se concentró hasta al menos 3 mg/ml mediante ultrafiltración. Los conjugados de los anticuerpos fueron estables en este tampón durante 5 semanas a 4 grados C. La concentración proteica se determinó mediante BCA, y la actividad de unión a antígeno se verificó mediante ELISA.

Radiomarcado de anticuerpos de RG1: Anticuerpos conjugados a DTPA se radiomarcaron con ^{90}Y o ^{111}In , en condiciones libres de metales, para uso en estudios in vivo en animales que poseen tumores. Típicamente, se mezclaron 10 mg de conjugado de anticuerpos con 10 mCi de $^{90}\text{YCl}_3$ o $^{111}\text{InCl}_3$ (PerkinElmer Life Sciences) durante 1 hora a temperatura ambiente con mezclamiento suave detrás de protección pesada. Se añadió EDTA hasta 1 mM y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se hizo pasar sobre una columna de desalación Pharmacia 26/10, que se había equilibrado previamente en PBS libre de metales, a fin de separar en anticuerpo radiomarcado de ^{90}Y no unido y para cambiar el tampón. Se recogieron fracciones de 1 ml, y las fracciones que contienen anticuerpos se reunieron. La concentración proteica se determinó mediante BCA. La radioactividad total en una muestra de 1 μl se determinó usando un contador de centelleo de líquidos para ^{90}Y , o un contador de radiación gamma para ^{111}In . La actividad específica se calculó como mCi por mg de proteína, y osciló típicamente de 0,25 a 1,0 mCi/mg. La pureza radiológica se determinó mediante cromatografía de capa fina instantánea (ITLC) según Nikula et al, Nucl. Med. Biol. 22: 387-390, 1995. Típicamente, más del 98% de la radioactividad estaba asociada con la proteína. La actividad de unión a antígeno del radioconjugado se determinó mediante ELISA frente a un patrón de anticuerpo no conjugado (conjugados de ^{90}Y), o usando un ensayo de unión radioinmunitario en fase sólida sobre proteína RG1 inmovilizada (conjugados de ^{111}In). En todos los casos, la unión de los conjugados al antígeno fue indistinguible de la del anticuerpo no conjugado.

Ejemplo 11: Acumulación específica de tumor de anticuerpos de RG1 marcados con ^{111}In

Se establecieron xenoinjertos tumorales mediante inyección s.c. de 1×10^7 células de LNCaP en matrigel en el flanco de ratones atímicos machos de 5-6 semanas. Se llevaron a cabo estudios de biodistribución cuando los tumores alcanzaron un volumen de 150-400 mm^3 (aproximadamente 4-6 semanas después de la inoculación de las células tumorales). Se administraron intravenosamente anticuerpos de RG1 humanos marcados con ^{111}In (C, B, A) y un anticuerpo de control de IgG₁ humano no específico (actividades específicas 0,3 mCi/mg), en cuatro grupos de 12 ratones que poseen xenoinjertos de LNCaP. Los ratones se desangraron mediante punción cardíaca antes de la disección. La sangre, el tumor y todos los órganos principales se retiraron, se pesaron en una balanza analítica, y se contó la radioactividad en un contador de radiación gamma. El aclaramiento corporal completo se determinó sumando la radioactividad medida en la sangre, órganos individuales, y en el cadáver que queda. Todos los datos se recogieron para decaimiento radioisotópico. Los resultados se expresaron como porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido. Los anticuerpos específicos de RG1 muestran una elevada acumulación específica de tumor (véase la Figura 1).

Ejemplo 12: Inhibición del crecimiento tumoral con anticuerpos de RG1 marcados con ^{90}Y

Se establecieron xenoinjertos tumorales mediante coinoculación s.c. de 1×10^7 células de LNCaP en matrigel en el flanco de ratones atímicos machos de 5-6 semanas. El tratamiento se inició cuando los tumores alcanzaron un volumen de 50-350 mm^3 (5 semanas después de la inoculación de las células tumorales). Los animales que poseen tumor se distribuyeron uniformemente en cuatro grupos de tratamiento ($n = 13/\text{grupo}$). Se administró una única inyección i.p. de anticuerpo radiomarcado B, C, e IgG₁ no específico (125 $\mu\text{Ci}/\text{animal}$) en ratones que poseen xenoinjertos de LNCaP. Al cuarto grupo de tratamiento se le administró una inyección i.p. de disolución salina. El efecto de los anticuerpos específicos de RG1 marcados con ^{90}Y sobre el crecimiento de los tumores derivados de LNCaP se monitorizó durante 32 días después de la inyección. En ese momento, los animales se sacrificaron, y los tumores se extrajeron y se pesaron. El estado de salud se determinó monitorizando el peso corporal. Una única administración de anticuerpos de RG1 humanos específicos marcados con ^{90}Y produjo una inhibición significativa del crecimiento tumoral cuando se compara con los resultados observados en los animales a los que se les inyectó con anticuerpo no específico marcado con ^{90}Y o el control de vehículo. (Véase la Figura 2).

Ejemplo 13: Clonación y expresión de anticuerpos de RG1 en células CHO

Mutagénesis: Se llevó a cabo mutagénesis dirigida al sitio del ADNc de tipo salvaje que codifica regiones variables del anticuerpo B y C anti-RG1, para generar alotipos que son expresados más frecuentemente en seres humanos. Para realizar la mutagénesis, se usó el método QuickChange® Multisite-directed Mutagenesis (Stratagene), con TOPO/BVH y TOPO/CVH (Medarex) como moldes. Se usaron cebadores (GGGGAGGCTTGGTACAACCTGGGGGGTCCCTGAG; SEC ID NO: 14) y (GAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAG; SEC ID NO: 15) para introducir las mutaciones de punto H13Q, M90T y M92V en ADNc de B (BVH_3m); y H13Q, M90T en ADNc de C (CVH_2m). Las mutaciones se confirmaron mediante análisis de secuencia de ADN, y dieron como resultado las regiones variables de cadena pesada mutantes con secuencias de SEC ID NO: 22 y SEC ID NO: 25, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos predichas para estas dos regiones variables de cadena pesada se dan mediante SEC ID NOS: 28 y 31, respectivamente.

5 Construcción de vectores de expresión: El vector de expresión de pIE_SRγ1fa (Medarex) contiene ADNc que codifica las regiones CH y CL de IgG1 humano (haplotipo fa) y cadenas kappa, respectivamente. Para permitir la clonación en el marco de las regiones variables de cadena ligera de B y C en pIE_SRγ1fa, se usó el par de cebadores BVK_F (GGGAAGCTTGCCACCATGGAA ACCCCAGCG; SEC ID NO: 16) y BVK_R (CAGTCGTACGTTT GATCTCCACCTTGGTCC; SEC ID NO: 17) para introducir sitios HindIII/Bsiw compatibles (subrayados) en los extremos 5' y 3', respectivamente, del ADNc de BVL y CVL. Los ADNc de VL generados mediante PCR resultantes se clonaron en el sitio HindIII/Bsiw de pIE_SRγ1fa para crear pIE/BVL y CVL. Se usó la misma estrategia para construir fusiones de VH en el marco (que incluyen BVH, BVH_3m, CVH y CVH_2m) en pIE/BVL y CVL. De forma breve, el par de cebadores de CVH_F (GTCAGGATGCGGCCGCCACCATGGAGTTTGTGCTGAGCT; SEC ID NO: 18) y CVH_R (ACCGATGGGCCCTTGGTGGA; SEC ID NO: 19) se usó para introducir sitios NotI/ApaI en los extremos de ADNc de VH amplificado mediante PCR. Los productos de la PCR se digirieron con NotI/ApaI y se insertaron en dirección de la región CH de pIE/BVL y pIE/CVL asegurando que las regiones VH estaban en el marco con región CH en los derivados de pIE respectivos. Los constructos finales se denominaron pIE/B, pIE/B_3m, pIE/C y pIE/C_2m. Todos los insertos se verificaron mediante análisis de secuencia de ADN.

10 Transfección y selección/amplificación de células DG44 y DXB11. Alrededor de 4×10^6 células DG44 y DXB11, suplementadas con medio F12 y 5% de FCS, se colocaron en placas P100 un día antes de la transfección. Las transfecciones se llevaron a cabo usando Lipfectamine 2000 (Invitrogen) y 24 µg de ADN plasmídico linealizado (pIE/B_3m o pIE/C_2m)/P100. El medio se cambió 4 horas después de la transfección. Se aplicaron condiciones selectivas aproximadamente 24 h después de la transfección.

25 La selección se llevó a cabo en primer lugar con medio MEM que contiene 5% de FBS dializado, 2 mM de L-glutamina y G418 (400 ug/ml), pero que carece de ribonucleósidos y desoxirribonucleósidos. Al alcanzar una confluencia de alrededor de 90%, las células se dividieron en 4 x placas P100 y se coseleccionaron con G418 más metotrexato a diversas concentraciones. Después de una semana, las células supervivientes se colocaron en placas de 96 pocillos a 100 células/placa en presencia de medio de coselección. Los clones que sobreviven se identificaron mediante ELISA para determinar la expresión de anticuerpo recombinante. El número de copias de genes de 10 clones que muestran los niveles más elevados de expresión se amplificó mediante selección consecutiva en presencia de concentraciones crecientes de metotrexato, y los clones escogidos se adaptaron a medio libre de suero para la preparación en un banco celular madre.

30 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Harkins, Richard Parkes, Deborah Parry, Gordon Parry, Renate Schneider, Douglas W.

<120> ANTICUERPOS DE RG1 Y SUS USOS

<130> SCH11717PCTEP

<140> US 10/895,183

35 <141> 20/07/2004

<150> US 60/489,032

<151> 22/07/2003

<160>31

<170> PatentIn version 3.4

40 <210> 1

<211> 1785

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

45 <221 > CDS

<222> (296)..(1291)

<400> 1

ES 2 427 544 T3

agaaaggggt gcggcagcac tgccagggga agagggatgat ccgacccggg gaaggtcgcct	60
gggcagggcg agttgggaaa gcggcagccc ccgccgcccc cgcagcccct tctcctcctt	120
tctcccacgt cctatctgcc tctcgtctgga ggccaggccg tgcagcatcg aagacaggag	180
gaactggagc ctcattggcc ggcccggggc gccggcctcg ggcttaaata ggagctccgg	240
gctctggctg ggacccgacc gctgccggcc gcgctcccgc tgctcctgcc gggtg atg	298
	Met 1
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
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
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
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
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
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
gcg gag cgc ggc 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
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

ES 2 427 544 T3

ccc agc ggc 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
 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
 ttc gtg ggc 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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 tgc 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 ggc 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
 tggggcccc cggagccatg ggggtgctggg ggctcctgtg caggctcatg ctgcaggcgg 1371
 ccgagggcac agggggtttc gcgctgctcc tgaccgcggt gaggccgcgc cgaccatctc 1431
 tgcaactgaag ggccctctgg tggccggcac gggcattggg aaacagcctc ctctttccc 1491
 aaccttgctt cttaggggcc cccgtgtccc gtctgctctc agcctctcc tctgcagga 1551
 taaagtcac cccaaggctc cagctactct aaattatgtc tccttataag ttattgctgc 1611
 tccaggagat tgtccttcat cgtccagggg cctggctccc acgtggttgc agatacctca 1671
 gacctggtgc tctaggctgt gctgagccca ctctcccagag ggcgcatcca agcgggggcc 1731
 acttgagaag tgaataaatg gggcggtttc ggaagcgtca aaaaaaaaaa aaaa 1785

<210> 2

<211> 331

ES 2 427 544 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Asn Pro Ser Pro Ala Ala Ala Leu Gly Lys Ala Leu Cys Ala

ES 2 427 544 T3

Glu Glu Ala Glu Cys Val Pro Asp Asn Cys Val
325 330

<210> 3
<211> 19
<212> ADN
5 <213> Artificial
<220>
<223> cebador
<400> 3
cgcgcatagc tccgactac 19
10 <210> 4
<211> 15
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
15 <223> cebador
<400> 4
gccgcgtccg caaag 15
<210> 5
<211> 30
20 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> sonda
<400> 5
25 aggaagaacc agtacgtcag taacgggctg 30
<210> 6
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial
30 <220>
<223> cebador
<400> 6
tccctctaga gccacatgg aaaaccccag cccggc 36
<210> 7
35 <211> 35
<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador2

<400> 7

5 aaggcatcac gtgtagacg cagttatcag ggacg 35

<210> 8

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 8

Pro Leu Gly Gly Glu ser Ile Cys Ser Ala Gly Ala Pro Ala Lys Tyr
 1 5 10 15

Ser Ile Thr

<210> 9

<211> 19

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 9

Thr Phe Thr Gly Lys Trp Ser Gln Thr Ala Phe Pro Lys Gln Tyr Pro
 1 5 10 15

Leu Phe Arg

<210> 10

<211> 15

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

His Ser Ser Asp Tyr Ser Met Trp Arg Lys Asn Gln Tyr Val Ser
 1 5 10 15

<210> 11

25 <211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Asp Ala Gly Thr Asp Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Pro Asn Phe Ala
1 5 10 15

Thr Ile Pro Gln Asp Thr Val
20

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 12

Asn Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Val Pro Glu Thr
1 5 10

<210> 13

<211> 330

10 <212> PRT

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 13

Met Glu Asn Val Ser Phe Ser Leu Asp Arg Thr Leu Trp Val Phe Leu
1 5 10 15

Leu Ala Met Leu Gly Ser Thr Ala Gly Gln Pro Leu Gly Gly Glu Ser
20 25 30

Val Cys Thr Ala Arg Pro Leu Ala Arg Tyr Ser Ile Thr Phe Thr Gly
35 40 45

Lys Trp Ser Gln Thr Ala Phe Pro Lys Gln Tyr Pro Leu Phe Arg Pro
50 55 60

ES 2 427 544 T3

Pro Ala Gln Trp Ser Ser Leu Leu Gly Ala Ala His Ser Ser Asp Tyr
 65 70 75 80
 Ser Met Trp Arg Lys Asn Glu Tyr Val Ser Asn Gly Leu Arg Asp Phe
 85 90 95
 Ala Glu Arg Gly Glu Ala Trp Ala Leu Met Lys Glu Ile Glu Ala Ala
 100 105 110
 Gly Glu Lys Leu Gln Ser Val His Ala Val Phe Ser Ala Pro Ala Val
 115 120 125
 Pro Ser Gly Thr Gly Gln Thr Ser Ala Glu Leu Glu Val His Pro Arg
 130 135 140
 His Ser Leu Val Ser Phe Val Val Arg Ile Val Pro Ser Pro Asp Trp
 145 150 155 160
 Phe Val Gly Ile Asp Ser Leu Asp Leu Cys Glu Gly Gly Arg Trp Lys
 165 170 175
 Glu Gln Val Val Leu Asp Leu Tyr Pro His Asp Ala Gly Thr Asp Ser
 180 185 190
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Pro Asn Phe Ala Thr Ile Pro Gln Asp Thr
 195 200 205
 Val Thr Glu Ile Thr Ala Ser Ser Pro Ser His Pro Ala Asn Ser Phe
 210 215 220
 Tyr Tyr Pro Arg Leu Lys Ser Leu Pro Pro Ile Ala Lys Val Thr Phe
 225 230 235 240
 Val Arg Leu Arg Gln Ser Pro Arg Ala Phe Ala Pro Pro Ser Leu Asp
 245 250 255
 Leu Ala Ser Arg Gly Asn Glu Ile Val Asp Ser Leu Ser Val Pro Glu
 260 265 270
 Thr Pro Leu Asp Cys Glu Val Ser Leu Trp Ser Ser Trp Gly Leu Cys
 275 280 285
 Gly Gly Pro Cys Gly Lys Leu Gly Ala Lys Ser Arg Thr Arg Tyr Val
 290 295 300
 Arg Val Gln Pro Ala Asn Asn Gly Thr Pro Cys Pro Glu Leu Glu Glu
 305 310 315 320
 Glu Ala Glu Cys Ala Pro Asp Asn Cys Val
 325 330

<210> 14

<211> 34

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 5 <400> 14
 ggggaggctt ggtacaacct ggggggtccc tgag 34
 <210> 15
 <211> 45
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 15
 gaacagcctg agagccgagg acacggctgt gtattactgt gcaag 45
 15 <210> 16
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223> cebador
 <400> 16
 ggaagcttg ccaccatgga aaccccagcg 30
 <210> 17
 <211> 30
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 17
 30 cagtcgtacg tttgatctcc accttggtcc 30
 <210> 18
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35 <220>
 <223> cebador
 <400> 18

ES 2 427 544 T3

gtcaggatgc ggccgccacc atggagtttg tgctgagct 39

<210> 19

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 19

accgatgggc ccttggtgga 20

10 <210> 20

<211> 381

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 20

atggaaacct cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 180

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 240

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 300

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatagta gctcgtcac tttcggcggg 360

gggaccaagg tggagatcaa a 381

15 <210> 21

<211> 441

<212> ADN

<213> Homo sapiens

20 <400> 21

atggagtttg tgctgagctg ggttttcctt gttgctatat taaaagggtg ccagtgtgag 60

gttcagctgg tgcagtctgg gggaggcttg gtacatcctg gggggtccct gagactctcc 120

tgtgcaggct ctggattcac cttcagtagc tatgttatgc actggcttcg ccaggctcca 180

ggaaaaggtc tggagtgggt atcagttatt ggtactggtg gtgtcacaca ctatgcagac 240

tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaatgcca agaactcctt gtatcttcaa 300

atgaacagcc tgagagccga ggacatggct atgtattact gtgcaagatg gggttactat 360

ggttcgggga gttatgagaa tgatgctttt gatatctggg gcccaaggac aatggtcacc 420

gtctcttcag cctccaccaa g 441

<210> 22

ES 2 427 544 T3

<211> 441

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 22

```

atggagtttg tgctgagctg ggttttcctt gttgctatat taaaaggtgt ccagtgtgag      60
gttcagctgg tgcagtctgg gggaggcttg gtacaacctg gggggtcctt gagactctcc      120
tgtgcaggct ctggattcac ctccagtagc tatgttatgc actggcttcg ccaggctcca      180
ggaaaaggtc tggagtgggt atcagttatt ggtactggtg gtgtcacaca ctatgcagac      240
tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaatgcc aagaactcctt gtatcttcaa      300
atgaacagcc tgagagccga ggacacggct gtgtattact gtgcaagatg gggttactat      360
ggttcgggga gttatgagaa tgatgctttt gatatctggg gccaaggac aatggtcacc      420
gtctcttcag cctccaccaa g                                     441

```

5

<210> 23

<211> 381

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 23

```

atggaaaccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga      60
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      120
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa      180
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca      240
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag      300
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcactcac tttcggcgga      360
gggaccaagg tggagatcaa a                                     381

```

<210> 24

<211> 423

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 24

15

ES 2 427 544 T3

atggagtttg tgctgagctg ggttttcctt gttgctatat taaaagggtg ccagtgtgag 60
 gttcagctgg tgcagtctgg gggaggcttg gtacatcctg gggggtcctt gagactctcc 120
 tgtgcaggct ctggattcac cttcagtagc tatgtcatgc actgggttcg ccaggctcca 180
 ggaaaaggtc tggagtgggt atcagtaatt ggtactggtg gtgtcacaaa ctatgcagac 240
 tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaatgcca agaactcctt gtatcttcaa 300
 atgaacagcc tgagagccga ggacatggct gtgtattact gtgcaagatg gggggactgg 360
 gatgatgctt ttgatatctg gggccaaggg acaatggtca ccgtctcttc agcctccacc 420
 aag 423

<210> 25

<211> 423

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 25

atggagtttg tgctgagctg ggttttcctt gttgctatat taaaagggtg ccagtgtgag 60
 gttcagctgg tgcagtctgg gggaggcttg gtacaacctg gggggtcctt gagactctcc 120
 tgtgcaggct ctggattcac cttcagtagc tatgtcatgc actgggttcg ccaggctcca 180
 ggaaaaggtc tggagtgggt atcagtaatt ggtactggtg gtgtcacaaa ctatgcagac 240
 tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaatgcca agaactcctt gtatcttcaa 300
 atgaacagcc tgagagccga ggacacggct gtgtattact gtgcaagatg gggggactgg 360
 gatgatgctt ttgatatctg gggccaaggg acaatggtca ccgtctcttc agcctccacc 420
 aag 423

<210> 26

<211> 127

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

ES 2 427 544 T3

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

<210> 27

<211> 147

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 27

ES 2 427 544 T3

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

<210> 28

<211> 147

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 28

Met Glu Phe Val Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Val Met His Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

ES 2 427 544 T3

Glu Trp Val Ser Val Ile Gly Thr Gly Gly Val Thr His Tyr Ala Asp
65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Glu Asn Asp
115 120 125

Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala
130 135 140

Ser Thr Lys
145

<210> 29

<211> 127

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 29

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
100 105 110

Gly Ser Ser Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 30

<211> 141

10 <212> PRT

ES 2 427 544 T3

<213> Homo sapiens

<400> 30

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

<210> 31

5 <211> 141

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

ES 2 427 544 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humano monoclonal aislado o un fragmento del mismo de unión a antígeno, en el que el anticuerpo comprende:

- 5 a) una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 26, y
- b) una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 27 o SEC ID NO: 28,

10 en el que el anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno se une específicamente a un epítipo presente en un polipéptido RG1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2; y muestra una elevada acumulación específica de tumor de manera que inhibe el crecimiento de células tumorales que expresan RG1 cuando se conjuga con un agente citotóxico.

2. Un anticuerpo humano monoclonal aislado o un fragmento del mismo de unión a antígeno, en el que el anticuerpo comprende:

- 15 a) una región variable de cadena ligera que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 29, y
- b) una región variable de cadena pesada que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 30 o SEC ID NO: 31,

20 en el que el anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno se une específicamente a un epítipo presente en un polipéptido RG1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2; y muestra una elevada acumulación específica de tumor de manera que inhibe el crecimiento de células tumorales que expresan RG1 cuando se conjuga con un agente citotóxico.

3. Un anticuerpo humano monoclonal aislado, o un fragmento del mismo de unión a antígeno, en el que el anticuerpo comprende:

- 25 a) una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 26, y
- b) una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 27 o SEC ID NO: 28,

y en el que el anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno se une específicamente a un epítipo presente en un polipéptido RG1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2.

30 4. Un anticuerpo humano monoclonal aislado, o un fragmento del mismo de unión a antígeno, en el que el anticuerpo comprende:

- a) una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 29, y
- b) una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 30 o SEC ID NO: 31,

35 y en el que el anticuerpo o fragmento del mismo de unión a antígeno se une específicamente a un epítipo presente en un polipéptido RG1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2.

5. El anticuerpo de la reivindicación 3, en el que la región variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 27.

6. El anticuerpo de la reivindicación 3, en el que la región variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 28.

40 7. El anticuerpo de la reivindicación 4, en el que la región variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 30.

8. El anticuerpo de la reivindicación 4, en el que la región variable de cadena pesada tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 31.

45 9. El fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 ó 4, en el que el fragmento de anticuerpo se selecciona de un grupo de fragmentos que consisten en fragmentos Fv, F(ab'), F(ab')₂, scFv, minicuerpo y diacuerpo.

10. Un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 ó 4, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo está conjugado a una molécula que es un agente terapéutico o un marcador detectable.

11. El inmunoconjugado de la reivindicación 10, en el que el agente terapéutico es un agente citotóxico.
12. El inmunoconjugado de la reivindicación 11, en el que el agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en ricina, doxorubicina, daunorrubicina, paclitaxel, bromuro de etidio, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colquicina, dihidroxiantracindiona, actinomicina D, toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas* (PE)A, PE40, ricina, abrina, glucocorticoide y radioisótopos.
13. El inmunoconjugado de la reivindicación 11, en el que el agente citotóxico es un radioisótopo y se selecciona del grupo que consiste en ^{48}Sc , ^{47}Sc , ^{48}Sc , ^{72}Ga , ^{73}Ga , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{109}Pd , ^{11}Ag , ^{149}Pm , ^{153}Sm , ^{168}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{211}At , ^{211}Bi , ^{212}Bi , ^{213}Bi y ^{214}Bi .
14. El inmunoconjugado de la reivindicación 10, en el que el marcador detectable es un radiomarcador, una enzima, un cromóforo, o un agente fluorescente.
15. El inmunoconjugado de la reivindicación 14, en el que el marcador detectable es un radiomarcador y se selecciona del grupo que consiste en ^{43}Sc , ^{44}Sc , ^{52}Fe , ^{55}Co , ^{68}Ga , ^{84}Cu , ^{86}Y , ^{94}mTc , ^{111}In , y $^{99\text{m}}\text{Tc}$.
16. El inmunoconjugado de la reivindicación 10, en el que la conjugación del anticuerpo o fragmento de anticuerpo con el agente terapéutico o marcador detectable utiliza un quelador seleccionado del grupo que consiste en p-SCN-bencil-DTPA y sus derivados, ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetraacético (DOTA) y sus derivados, y ácido 1,4,7-triazaciclononano-N,N',N''-triacético (NOTA) y sus derivados.
17. El inmunoconjugado de la reivindicación 16, en el que el quelador usado es ciclohexil-DTPA (CHX-A"-DTPA) o MX-DTPA (1 B4M-DTPA).
18. Una molécula de anticuerpo monocatenaria que se une al polipéptido RG1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2, en el que la molécula de anticuerpo monocatenaria comprende una región de unión a antígeno del anticuerpo de las reivindicaciones 1, 2, 3 ó 4.
19. El inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, para uso en terapia o diagnóstico.
20. El uso del inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, para la preparación de una composición farmacéutica para tratar o diagnosticar cáncer.
21. El inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17, para uso en el tratamiento o diagnóstico de cáncer.
22. El uso de la reivindicación 20 o el inmunoconjugado de la reivindicación 21 para uso como se define en dicha reivindicación, en el que el cáncer es cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer ovárico o cáncer colorrectal.
23. Un método *in vitro* o *ex vivo* para destruir selectivamente una célula que expresa un polipéptido RG1 humano que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2, que comprende hacer reaccionar el inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 17 con la célula de manera que se destruya a la célula.
24. Un anticuerpo monoclonal humano o humanizado aislado o un fragmento del mismo de unión a antígeno, que compete con el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3 ó 4 por la unión al polipéptido RG1 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2.
25. El anticuerpo humano aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para uso en terapia o diagnóstico.
26. El uso del anticuerpo humano aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para la preparación de una composición farmacéutica para tratar o diagnosticar cáncer.
27. El anticuerpo humano aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para uso en el tratamiento o diagnóstico de cáncer.
28. El uso de la reivindicación 26 o el anticuerpo humano aislado de la reivindicación 27 para uso como se define en dicha reivindicación, en el que el cáncer es cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer ovárico o cáncer colorrectal.
29. El anticuerpo humano aislado o un fragmento del mismo de unión a antígeno de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo humano aislado o un fragmento del mismo de unión a antígeno se une a RG1 con una afinidad de al menos 10^8 M.

Figura 1

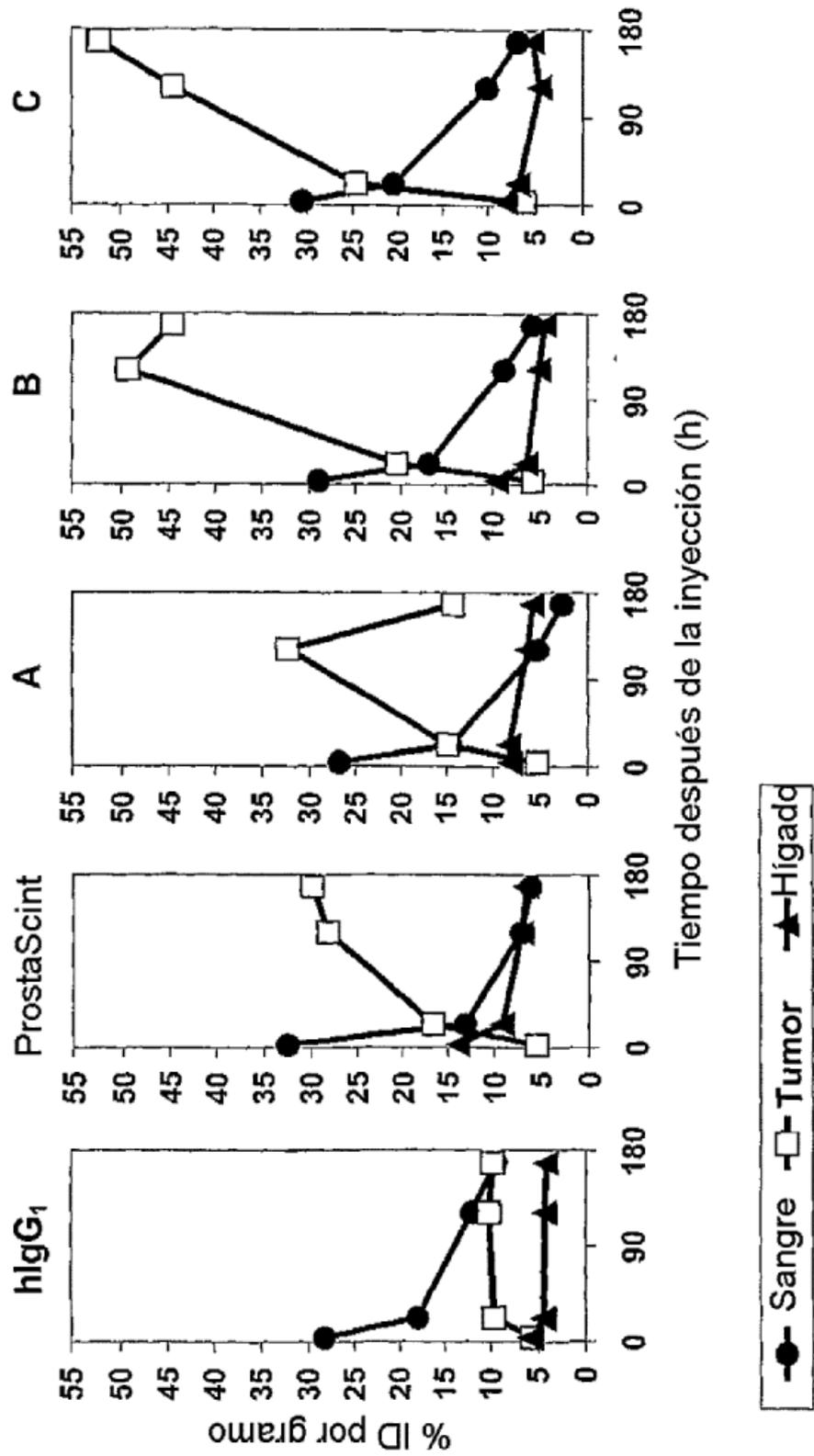


Figura 2

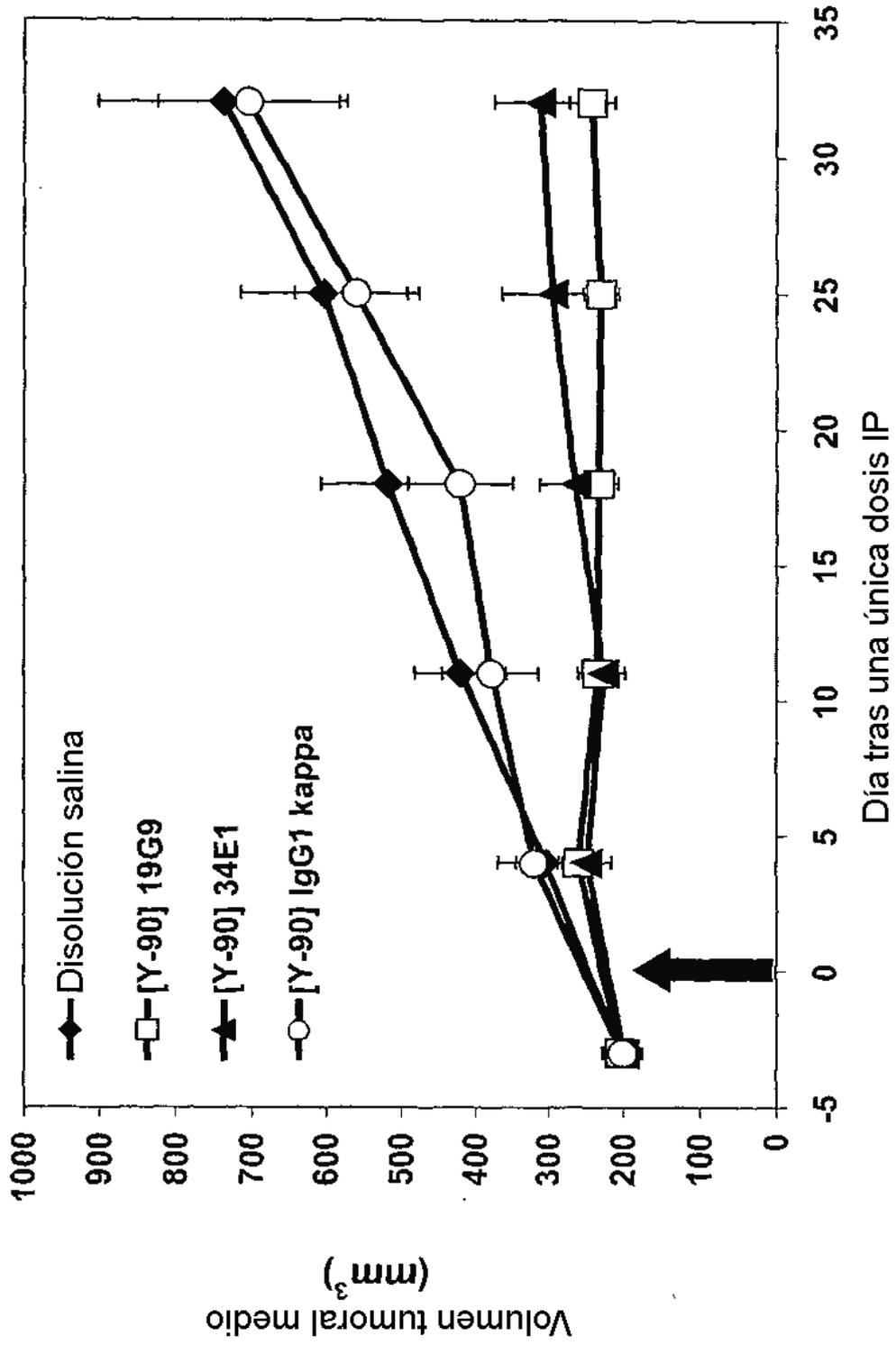


FIGURA 3

Secuencias de la región variable de huMAb B

V_L

1 METPAQLLFLLLLLWLPD TTGEIVLTQSPGTL SLSLSPGERATL SCRASQSVS 50
 51 SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE 100
 101 PEDFAVYYCQQYSSSLTFGGGTKVEIK 150

V_H

1 MEFVLSWVFLVAILKGVQCEVQLVQSGGGLVHPGGSRLRLSCAGSGFTFSS 50
 51 YVMHWLRQAPGKGLEWVSVIGTGGVTHYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQ 100
 101 MNSLRAEDMAMYCARWGYGSGSYENDAFDIWGQGTMTVTVSSASTK 150

B_3M, V_H (mutaciones en negrita)

1 MEFVLSWVFLVAILKGVQCEVQLVQSGGGLVQPGGSRLRLSCAGSGFTFSS 50
 51 YVMHWLRQAPGKGLEWVSVIGTGGVTHYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQ 100
 101 MNSLRAEDTAVYYCARWGYGSGSYENDAFDIWGQGTMTVTVSSASTK 150

Las secuencias de CDR (1, 2, y 3) para cada región variable están subrayadas

FIGURA 4

Secuencias de la región variable de huMAb C

V_L

```

1 METPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPGTLSLSLSPGERATLSSCRASQSVS 50
. . . . .
51 SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE 100
. . . . .
101 PEDFAVYYCQQYGSSLTFGGGTKVEIK 150
    
```

V_H

```

1 MEFVLSWVFLVAILKGVQCEVQLVQSGGGLVHPPGSLRLSCAGSGFTFSS 50
. . . . .
51 YVMHWVRQAPGKGLEWVSVIGTGGVTNYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ 100
. . . . .
101 MNSLRAEDMAVYYCARWGDWDDAFDIWGQGMVTVSSASTK 144
    
```

C_{2m}, V_H (mutaciones en negrita)

```

1 MEFVLSWVFLVAILKGVQCEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSS 50
. . . . .
51 YVMHWVRQAPGKGLEWVSVIGTGGVTNYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ 100
. . . . .
101 MNSLRAEDTAVYYCARWGDWDDAFDIWGQGMVTVSSASTK 144
    
```

Las secuencias de CDR (CDR1, 2, y 3) para cada región variable están subrayadas