



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 117**

51 Int. Cl.:
C07K 14/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **99927164 .6**
96 Fecha de presentación : **01.06.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1082341**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.03.2001**

54 Título: **Antígeno tumoral útil en el diagnóstico y la terapia de cáncer de colon y de próstata.**

30 Prioridad: **01.06.1998 US 87598 P**
29.06.1998 US 91474 P
14.04.1999 US 129521 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.04.2011

73 Titular/es: **AGENSYS, Inc.**
2225 Colorado Avenue
Santa Monica, California 90404, US

72 Inventor/es: **Afar, Daniel, E.;**
Hubert, Rene, S.;
Leong, Kahan;
Raitano, Arthur, B.;
Saffran, Douglas, C. y
Mitchell, Stephen Chappell

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 356 117 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

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El cáncer de próstata es el cáncer más frecuentemente diagnosticado y la segunda causa principal de muerte por cáncer en los hombres. Unos 45.000 hombres mueren anualmente de esta enfermedad. Sólo el cáncer de pulmón tiene una mayor mortalidad. La posibilidad de que un hombre desarrolle cáncer de próstata invasivo durante su vida es 1 de 6. A la edad de 50, un hombre tiene una posibilidad superior al 40% de desarrollar cáncer de próstata y una probabilidad de casi el 3% de morir de esta enfermedad. Aunque se han logrado algunos avances en el tratamiento de tumores localmente confinados, el cáncer de próstata es incurable una vez ha metastatizado. Los pacientes con cáncer de próstata metastásico se tratan mediante terapia de ablación hormonal, pero sólo con éxito a corto plazo. Eventualmente, estos pacientes desarrollan un estado resistente a andrógenos que conduce a la progresión de la enfermedad y a la muerte.

Un problema continuado y fundamental en el control del cáncer de próstata es la ausencia de marcadores de diagnóstico y de pronóstico fidedignos que puedan detectar con exactitud tumores localizados en fase precoz y/o predecir susceptibilidad a enfermedad y progresión. La detección y el diagnóstico precoz de cáncer de próstata se basan actualmente en el examen rectal digital (ERD), mediciones del antígeno específico de la próstata (PSA), ultrasonografía transrectal (USTR) y biopsia transrectal con aguja (BTRA). Las mediciones de PSA en suero en combinación con ERD representan la principal solución de diagnóstico en este momento. Sin embargo, esta solución tiene importantes limitaciones que han avivado una intensa investigación para encontrar mejores marcadores de diagnóstico de esta enfermedad. Se han identificado varios marcadores, y al menos un PSA tiene un uso clínico generalizado. Sin embargo, los marcadores de tumor de próstata ideales han sido extremadamente escurridizos y ningún marcador ha demostrado todavía ser fidedigno para predecir la progresión de la enfermedad. Por tanto, existe la necesidad de procedimientos de diagnóstico y de pronóstico más fidedignos e informativos en el control del cáncer de próstata.

Además, también existe un gran interés por identificar proteínas específicas de la próstata que podrían ser apropiadas como dianas terapéuticas ya que no hay tratamiento eficaz para pacientes que desarrollan enfermedad recurrente o a los que se les ha diagnosticado enfermedad metastásica. Aunque la terapia de ablación hormonal puede aliviar a estos pacientes, la mayoría progresa inevitablemente para desarrollar enfermedad incurable independiente de andrógenos (Lalani y col., 1997, Cancer Metastasis Rev. 16: 29-66).

El PSA es el marcador tumoral más ampliamente usado hoy en día para cribar, diagnosticar y monitorizar cáncer de próstata. En particular, varios inmunoensayos para la detección de PSA en suero tienen un uso clínico generalizado. Recientemente se ha desarrollado un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) para ARNm de PSA en suero. Sin embargo, el PSA no es un marcador específico de la enfermedad ya que niveles elevados de PSA son detectables en un gran porcentaje de pacientes con HBP y prostatitis (25-86%) (Gao y col., 1997, Prostate 31: 264-281), además de en otros trastornos no malignos, y en algunos hombres normales un factor que limita significativamente la especificidad de diagnóstico de este marcador. Por ejemplo, en HBP se observan elevaciones en PSA en suero de entre 4 y 10 ng/ml, e incluso se observan mayores valores en prostatitis, particularmente prostatitis aguda. La HBP es una afección extremadamente común en hombres. Para confundir más la situación está el hecho de que las elevaciones de PSA en suero pueden observarse sin ninguna indicación de enfermedad de ERD, y viceversa. Además, ahora se reconoce que el PSA no es específico de la próstata (Gao y col., anteriormente, para revisión).

Se han descrito diversos procedimientos diseñados para mejorar la especificidad de la detección basada en PSA tales como la medición de la densidad de PSA y la relación de PSA libre frente a complejo. Sin embargo, ninguna de estas metodologías puede distinguir reproduciblemente enfermedad de próstata benigna de maligna. Además, los diagnósticos de PSA tienen sensibilidades de entre el 57-79% (Cupp & Osterling, 1993, Mayo Clin Proc 68:297-306), y por tanto, erran en la identificación de cáncer de próstata en una población significativa de hombres con la enfermedad.

El antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) es un marcador de la superficie celular de cáncer de próstata recientemente descrito que ha sido objeto de diversos estudios que evalúan su uso como marcador de diagnóstico y terapéutico. La expresión de PSMA se limita en gran parte a tejidos de la próstata, pero se han observado niveles detectables de ARNm de PSMA en el cerebro, la glándula salival, el intestino delgado y carcinoma de células renales (Israeli y col., 1993, Cancer Res 53: 227-230). La proteína de PSMA se expresa en gran parte en la mayoría de los cánceres de próstata primarios y metastásicos, pero también se expresa en la mayoría de los especímenes de neoplasia intraepitelial (Gao y col., anteriormente). Los resultados preliminares usando un anticuerpo monoclonal dirigido contra PSMA marcado con indio 111 para obtener imágenes de cáncer de próstata recurrente muestran algunas promesas (Sodee y col., 1996, Clin Nuc Med 21: 759-766). El PSMA es un antígeno dependiente de hormonas que requiere la presencia de receptores androgénicos funcionales. Como no todas las células de cáncer de próstata expresan el receptor androgénico, la utilidad clínica de PSMA como diana terapéutica puede limitarse inherentemente. También están en curso ensayos clínicos diseñados para examinar la

eficacia de la inmunoterapia de PSMA.

El antígeno de citoblastos de la próstata (PSCA) es otro marcador de la superficie celular de cáncer de próstata muy recientemente descrito (Reiter y col., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 1735-1740). Se ha mostrado que la expresión de PSCA es específica de la próstata y se expresa en gran parte en exceso a través de todas las fases del cáncer de próstata que incluyen neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (PIN), tumores de próstata dependientes de andrógenos e independientes de andrógenos. El gen de PSCA se ha mapeado para el cromosoma 8q24.2, una región de aumento alélico en más del 80% de los cánceres de próstata. El PSCA es prometedor como diana de diagnóstico y terapéutica en vista de su localización en la superficie celular, especificidad por la próstata y expresión enormemente regulada por incremento en células de cáncer de próstata.

El progreso en la identificación de marcadores específicos ha sido lento debido a la falta de sistemas de modelos animales experimentales que recapitulen la enfermedad clínica. Las soluciones intentadas para este problema han incluido la generación de líneas celulares de cáncer de próstata (Horoszewicz y col., 1983, Cancer Res. 43, 1809) y xenoinjertos de cáncer de próstata (Pretlow y col., 1991, Cancer Res. 51, 3814; van Weerden y col., 1996, Am. J. Patol. 149, 1055; Klein y col., 1997, Nature Med. 3, 402). Sin embargo, estas soluciones han tenido un éxito limitado. Por ejemplo, los xenoinjertos han producido generalmente tasas de supervivencia a largo plazo bajas. Además, se ha mostrado que ninguna de la mayoría de las líneas celulares de cáncer de próstata ampliamente usadas - PC-3, DU-145 y LNCaP - da lugar de forma reproducible a lesiones osteoblásticas típicas de cáncer de próstata. Otra limitación de las líneas celulares DU-145 y PC-3 es que estas células no expresan el antígeno específico de la próstata (PSA) o el receptor androgénico (AR) (Kaighn y col., 1979, Invest. Urol. 17: 16-23; Gleave y col., 1992, Cancer Res. 52: 1598-1605), cuestionando su relevancia para el cáncer de próstata clínico. La línea celular LNCaP es sensible a andrógenos y expresa PSA, pero contiene una mutación en el receptor androgénico que altera la especificidad por ligandos.

Sin embargo, recientemente se ha descrito una serie de xenoinjertos de cáncer de próstata (derivados de tumores de pacientes) demostrando características genéticas y fenotípicas que muestran un estrecho paralelismo con la situación clínica humana (Klein y col., 1997, Nature Med. 3: 402). Estos xenoinjertos de LAPC (Los Angeles Prostate Cancer) han sobrevivido al paso en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (IDCG) durante más de un año. El sistema del modelo de xenoinjerto de LAPC-4 tiene la capacidad de imitar la transición de dependencia de andrógenos a independencia de andrógenos (Klein y col., 1997, anteriormente). Los tumores de LAPC-4 experimentan un retroceso en ratones macho después de la castración, pero vuelven a crecer dentro de 2-3 meses como tumores independientes de andrógenos. Tanto los tumores de xenoinjertos de LAPC-4 dependientes de andrógenos (DA) como independientes de andrógenos (IA) expresan niveles iguales de los marcadores específicos de la próstata PSA, PSMA (antígeno de membrana específico de la próstata) y PSCA (antígeno de citoblastos de la próstata) que se identificaron usando análisis de diferencias representativas de ADNc derivados de las variantes DA e IA del xenoinjerto de LAPC-4.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a procedimientos y a composiciones para el diagnóstico y la terapia de cáncer de próstata y de colon derivados de o basados en una novedosa serina-proteasa de la superficie celular específica de la próstata regulada por andrógenos llamada 20P1F12/TMPRSS2 y ampliamente descrita en este documento. Se proporciona un ADNc de longitud completa que comprende toda la secuencia codificante del gen 20P1F12/TMPRSS2 (también designado 20P1F12-GTC1 en este documento) (FIG. 1). Este ADNc codifica una proteína que está altamente relacionada con, pero estructuralmente distinta de, el TMPRSS2 recientemente publicado (Paoloni-Giacobino y col., 1997 Genomics 44: 309-320). El gen 20P1F12/TMPRSS2 también muestra un patrón de expresión muy diferente con respecto al perfil de expresión de TMPRSS2.

Según un aspecto de la presente invención se proporciona una proteína 20P1F12/TMPRSS2 aislada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la FIG. 1. En otro aspecto de la presente invención se proporciona un polinucleótido aislado seleccionado de (a) un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos que se muestra en la FIG. 1, en la que T también puede ser U; (b) un polinucleótido que codifica un polipéptido 20P1F12/TMPRSS2 cuya secuencia está codificada en el ADNc contenido en el plásmido p20P1F12-GTC1 como se ha depositado en la Colección americana de cultivos tipo como n° de registro 207097; y (c) un polinucleótido que codifica la proteína 20P1F12/TMPRSS2 de la FIG. 1.

También se proporcionan moléculas de ADN recombinante que contienen polinucleótidos 20P1F12/TMPRSS2, células transformadas o transducidas con tales moléculas, y sistemas de vectores huésped para la expresión de productos génicos de 20P1F12/TMPRSS2.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un ensayo para determinar la presencia de cáncer de próstata o de colon en un individuo que comprende poner en contacto una muestra de prueba de tejido de próstata o de colon con un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a la proteína que está constituida por la secuencia de aminoácidos de la FIG. 1, y cuyo anticuerpo está marcado con un marcador detectable, y detectar la unión de la

proteína 20P1F12/TMPRSS2 en la muestra al mismo, en el que un aumento significativo en la expresión de la proteína 20P1F12/TMPRSS2 en la muestra de tejido de prueba con respecto a los niveles de expresión en el tejido normal correspondiente indica la presencia de cáncer de próstata o de colon.

5 En otro aspecto, la invención proporciona un ensayo para determinar la presencia de cáncer de próstata o de colon en un individuo que comprende:

(a) poner en contacto una muestra de tejido de próstata o de colon con una sonda de polinucleótidos que se hibrida específicamente con el polinucleótido de la FIG. 1; y

10 (b) detectar la presencia de un complejo de hibridación formado por la hibridación de la sonda con el polinucleótido 20P1F12/TMPRSS2 en la muestra, en el que la presencia del complejo de hibridación indica la presencia del polinucleótido 20P1F12/TMPRSS2 dentro de la muestra, en el que un aumento significativo en el polinucleótido 20P1F12/TMPRSS2 en la muestra con respecto a niveles en un tejido normal correspondiente indica la presencia de cáncer.

En otro aspecto, la invención proporciona un ensayo para determinar la presencia de cáncer de próstata o de colon en un individuo que comprende:

15 (a) producir ADNc de una muestra de tejido de próstata o de colon por transcripción inversa usando al menos un cebador;

(b) amplificar el ADNc así producido usando cebadores de sentido directo y de sentido contrario para amplificar ADNc de 20P1F12/TMPRSS2 en su interior; y

(c) detectar la presencia del ADNc de 20P1F12/TMPRSS2 amplificado,

20 en el que los cebadores de sentido directo y de sentido contrario pueden amplificar el polinucleótido de la FIG. 1, y en el que un aumento significativo en el ARNm o ADNc de 20P1F12/TMPRSS2 en la muestra de tejido de prueba con respecto a niveles en un tejido normal correspondiente indica la presencia de cáncer de próstata o de colon.

25 La invención también proporciona un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une inmunoespecíficamente a la proteína que está constituida por la secuencia de aminoácidos de la FIG. 1 para uso en un procedimiento para el tratamiento de cáncer de próstata. Los anticuerpos que se unen a la proteína de la FIG. 1 incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales, anticuerpos murinos y de otros mamíferos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y completamente humanos y anticuerpos marcados con un marcador detectable o toxina o composición terapéutica. En este documento también se describen varios anticuerpos monoclonales específicamente reactivos con 20P1F12/TMPRSS2. Estos y otros anticuerpos 20P1F12/TMPRSS2 son útiles en ensayos de diagnóstico molecular y procedimientos de obtención de imágenes de diagnóstico para detectar, localizar y caracterizar carcinomas de próstata y de colon y metástasis de los mismos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1. Secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducidas del clon de ADNc 20P1F12-GTC1 (Ejemplo 3) (como se ha depositado en la ATCC; nº de registro 207097).

35 FIG. 2. Secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducidas de la secuencia del gen TMPRSS2 como se ha publicado en Paoloni-Giacobino y col., 1997, Genomics 44: 309-320.

FIG. 3. Alineamiento de secuencias de aminoácidos comparando ADNc de 20P1F12-GTC1 (Ejemplo 3) con la secuencia previamente publicada de TMPRSS2 (Paoloni-Giacobino y col., 1997, Genomics 44: 309-320). Las diferencias de aminoácidos se muestran en negrita.

40 FIG. 4. Secuencia de nucleótidos del clon inicialmente aislado por SSH 20P1F12.

FIG. 5. Análisis por RT-PCR de la expresión del gen 20P1F12/TMPRSS2 en xenoinjertos de cáncer de próstata, próstata normal y otros tejidos y líneas celulares que muestran niveles de expresión aproximadamente iguales en próstata normal y tres xenoinjertos de cáncer de próstata (Panel A); y que muestran expresión en gran parte específica de la próstata en tejidos humanos normales con niveles de expresión significativamente más bajos detectables en colon, páncreas, riñón y pulmón (Paneles B y C).

45 FIG. 6. Análisis de transferencia Northern de la expresión del gen 20P1F12/TMPRSS2 en tejidos humanos normales y xenoinjertos de cáncer de próstata usando la sonda de ADNc de 20P1F12 del clon marcado. Paneles A y B: Expresión en 16 tejidos normales en gran parte restringidos a próstata; mostrando el riñón, el páncreas y el pulmón niveles de expresión de 10 a 20 veces más bajos. Panel C: Expresión en xenoinjertos de cáncer de próstata de LAPC-4 y diversas líneas celulares que muestran un alto nivel expresión en xenoinjertos de cáncer de próstata, algunas de las líneas celulares de cáncer de próstata y en una línea celular de carcinoma de colon. Excepto LAPC-9 IA, la expresión de 20P1F12/TMPRSS2 en los xenoinjertos

fue comparable con los niveles observados en muestras de próstata normal. Además, se observó un menor nivel de expresión en la línea de carcinoma epidermoide A431.

FIG. 7. Expresión de 20P1F12/TMPRSS2 en líneas celulares de cáncer de próstata y de colon. Los filtros de xenoinjertos y de líneas celulares se prepararon con 10 µg de ARN total por banda. Las transferencias se analizaron usando una sonda de fragmento génico derivada de 20P1F12/TMPRSS2. Todas las muestras de ARN se normalizaron por tinción con bromuro de etidio. Kilobases= kb.

FIG. 8. Caracterización de anticuerpos monoclonales dirigidos contra 20P1F12/TMPRSS2. Se generaron anticuerpos monoclonales hacia 20P1F12/TMPRSS2 usando una proteína de fusión GST-20P1F12/TMPRSS2 purificada como se describe en el Ejemplo 5. Los sobrenadantes de hibridoma se cribaron inicialmente por ELISA contra la proteína 20P1F12/TMPRSS2 purificada escindida de la fusión con GST. Un cribado secundario implicó la transferencia Western contra lisados derivados de células 293T transfectadas con un vector retroviral que codificaba 20P1F12/TMPRSS2. (A) Se usaron seis mAb (1F9, 2D10, 2F8, 6B11, 8C6 y 9G8) que reconocen específicamente 20P1F12/TMPRSS2 para sondar transferencias Western a partir de lisados celulares derivados de células 293T transfectadas con tanto 20P1F12/TMPRSS2 (banda 1) como neo (como control, banda 2). (B) Los lisados celulares de células 293T transfectadas con 20P1F12/TMPRSS2 (banda 1) o neo (como control, banda 2), LAPC-9 DA y LNCaP se sondaron con el mAb dirigido contra TMPRSS2 1F9. Los patrones de peso molecular se indican al lado en kilodalton (KD).

FIG. 9. Biotinilación de la superficie celular de 20P1F12/TMPRSS2. (A) Se transfectaron 20P1F12/TMPRSS2 marcado con His o neo (como control) en células 293T. Se incubaron células intactas con biotina para biotinilar todas las proteínas de la superficie celular. Los lisados celulares se analizaron tanto por transferencia Western directamente (bandas 1 y 2) como se incubaron con estreptavidina para purificar por afinidad todas las proteínas marcadas de la superficie celular. Las proteínas de la superficie celular purificadas con estreptavidina se analizaron por transferencia Western usando anticuerpos dirigidos contra His (bandas 3 y 4). La proteína biotinilada sólo se detectó en células transfectadas de 20P1F12/TMPRSS2. (B) Se incubaron PC-3 (banda 2) y LNCaP (banda 4) biotiniladas, y PC-3 (banda 1) y LNCaP (banda 3) sin marcar con gel de estreptavidina y luego se analizaron por transferencia Western usando el mAb 1F9. 20P1F12/TMPRSS2 sólo se detectó en muestras biotiniladas. Los patrones de peso molecular se indican al lado en kilodalton (KD).

FIG. 10. Desglucosilación de 20P1F12/TMPRSS2 en células 293T transfectadas. 20P1F12/TMPRSS2 marcado con His transfectado en células 293T se purificó usando níquel-agarosa. Entonces, la proteína 20P1F12/TMPRSS2 se desglucosiló usando N-glucosidasa F. 20P1F12/TMPRSS2 sin tratar (banda 1) y la proteína desglucosilada (banda 2) se analizaron por transferencia Western usando anticuerpos dirigidos contra His. Se detecta un desplazamiento en el peso molecular con desglucosilación. Los patrones de peso molecular se indican al lado en kilodalton (KD).

FIG. 11. Regulación por andrógenos de la proteasa de la superficie celular 20P1F12/TMPRSS2. Las células LNCaP se privaron de andrógenos haciendo crecer las células en suero bovino fetal tratado con carbón vegetal al 2% durante 1 semana (banda 1), o 24 horas (banda 3). La regulación por andrógenos se determinó estimulando células privadas durante 24 horas con mibolerona 10 nM (análogo de andrógeno) durante 9 horas (banda 4). La expresión de 20P1F12/TMPRSS2 se comparó con niveles de 20P1F12/TMPRSS2 en células LNCaP que crecían en medio completo (banda 2) por transferencia Northern de 10 µg de ARN/banda sondado con una sonda de 20P1F12/TMPRSS2. La misma carga de ARN se determinó por tinción con bromuro de etidio y posterior sondado con una sonda de β-actina. Los niveles de PSA se determinaron como control para la regulación por andrógenos. Los patrones de peso molecular se indican al lado en kilobases (kb).

FIG. 12. Regulación por andrógenos de 20P1F12/TMPRSS2 en LNCaP. Las células LNCaP se privaron de andrógenos haciendo crecer las células en suero bovino fetal tratado con carbono vegetal al 2% durante 1 semana. La regulación por andrógenos se determinó estimulando células con mibolerona (Mib) durante diversos momentos de tiempo. La expresión de 20P1F12/TMPRSS2 se determinó por transferencia Western de lisados celulares usando el mAb dirigido contra 1F9. Como controles adicionales se usaron lisados celulares de células PC-3 infectados con tanto neo (como control) como 20P1F12/TMPRSS2. La misma carga de proteínas se determinó sondando la transferencia Western con anticuerpos dirigidos contra Grb-2 (Transduction Laboratories) (datos no mostrados). La expresión de la proteína 20P1F12/TMPRSS2 se comparó con los niveles de ARN por transferencia Northern de 10 µg de ARN/banda sondados con una sonda de 20P1F12/TMPRSS2. La misma carga de proteínas se determinó sondando la transferencia Northern con una sonda de β-actina.

FIG. 13. Efecto de la expresión de 20P1F12/TMPRSS2 en células NIH 3T3. Se infectaron células NIH 3T3 con retrovirus que codifican tanto neo (como control) como 20P1F12/TMPRSS2. Cuarenta y ocho horas

después de la infección las células se analizaron por microscopía óptica. Las células que pareció que acumulaban altos números de vacuolas se indican con flechas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a procedimientos y a composiciones para el diagnóstico y la terapia de cáncer de próstata que utilizan polinucleótidos aislados correspondientes al gen 20P1F12/TMPRSS2, proteínas codificadas por el gen 20P1F12/TMPRSS2 y anticuerpos que pueden reconocer y unirse específicamente a proteínas 20P1F12/TMPRSS2. El gen 20P1F12/TMPRSS2 codifica una proteína multimérica predicha de 492 aminoácidos que contiene un dominio de serina-proteasa, un dominio rico en cisteínas de receptores depuradores, un dominio de clase A de receptores de LDL y un dominio transmembrana predicho como se ha descrito para TMPRSS2 (Paoloni-Giacobino y col., 1997, Genomics 44: 309-320). Paoloni-Giacobino y col. encontraron que el gen TMPRSS2 se expresa fuertemente en el intestino delgado y sólo débilmente en varios otros tejidos y también se ha mapeado el gen TMPRSS2 para el cromosoma 21. La función fisiológica de TMPRSS2 es desconocida. Los solicitantes han clonado un ADNc de longitud completa que comprende la región codificante completa del gen 20P1F12/TMPRSS2, pero contiene varias diferencias de secuencias de nucleótidos con respecto a la secuencia publicada de TMPRSS2. Cinco de estas diferencias de secuencias producen diferencias de aminoácidos. La naturaleza y la significancia de estos cambios son actualmente desconocidos. Además, la novedosa 20P1F12/TMPRSS2 de los solicitantes tiene un patrón de expresión completamente diferente en comparación con el que se ha encontrado para el TMPRSS2 previamente informado.

Debido a que 20P1F12/TMPRSS2 es una proteasa específica de la próstata, es posible que funcione directamente en el desarrollo y/o la progresión de cáncer de próstata, particularmente en el desarrollo de enfermedad metastásica. A este respecto, las proteasas se conocen por participan en la invasión y la metástasis de células cancerosas (Henriet y col., 1999, APMIS 107(1):111-9; Rochefort y col., 1999, APMIS 107(1):86-95; Webber y col., 1995, Clin Cancer Res 1(10):1089-94; Duffy, 1996, Clin Cancer Res 2(4):613-8; Webber y Waghray, 1995 Clin Cancer Res 1(7):755-61). Por ejemplo, se cree que el activador de plasminógeno de tipo urocinasa (u-PA), la cathepsina D y PSA contribuyen a la capacidad de metastatizar de las células de cáncer de próstata. La posible implicación directa de la función de 20P1F12/TMPRSS2 en cáncer de próstata, y particularmente en metástasis, puede evaluarse como se describe en el Ejemplo 5.

Interesantemente, la estructura primaria de 20P1F12/TMPRSS2 y TMPRSS2 contiene dominios de interacción proteína-proteína y un dominio de proteasa extracelular. La función de 20P1F12/TMPRSS2 y TMPRSS2 no está clara. La función de 20P1F12/TMPRSS2 y TMPRSS2 puede implicar unión a proteínas del sustrato en el medio extracelular mediante su SRCR y/o dominios de LDLA. Ejemplos de proteínas que presentan dominios SRCR incluyen: CD6, una molécula de adhesión que se une a ALCAM (molécula de adhesión celular a leucocitos activados) y media en la unión a células del epitelio tímico de timocitos (Whitney y col., 1995, J Biol Chem 270:18187); CD5 (Ly-1), una proteína de linfocitos T se une a CD72 en linfocitos B y puede participar en la comunicación de linfocitos T-B (Luo y col., 1992, J Immunol 148:1630); BSSP-3, una serina-proteasa específica del cerebro con una estructura similar a rosquilla y tres motivos ricos en cisteínas de receptores depuradores (Yamamura y col., 1997, Biochem Biophys Res Commun 239:386).

El dominio de proteasa de 20P1F12/TMPRSS2 es el más homólogo para el dominio de proteasa de hepsina (TMPRSS1), una serina-proteasa transmembrana que se expresa altamente en hígado y está regulada por incremento en cáncer de ovario (Leyus y col., 1988, Biochemistry 27: 1067-74; Tanimoto y col., 1997, Cancer Res. 57: 2884-2887).

La invención se basa en parte en el aislamiento de un fragmento de ADNc correspondiente al gen 20P1F12/TMPRSS2 mediante clonación por hibridación sustractiva por supresión y según los detallados estudios de caracterización molecular y bioquímica descritos en los ejemplos. El fragmento de ADNc inicialmente aislado, el clon 20P1F12, mostró identidad en una parte de solapamiento de la secuencia sin traducir en 3' del ADNc de longitud completa recientemente descrito que codifica TMPRSS2. Entonces, los cebadores diseñados para amplificar específicamente el gen correspondiente a 20P1F12 se usaron para caracterizar la expresión de 20P1F12/TMPRSS2 en xenoinjertos de cáncer de próstata, próstata normal y una variedad de otros tejidos normales. Un ADNc de longitud completa que comprende la secuencia codificante completa del gen 20P1F12/TMPRSS2 ha sido aislado y secuenciado y se proporciona en este documento.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos deducidas del novedoso gen 20P1F12/TMPRSS2 (también designado 20P1F12-GTC1 en este documento) se muestran en la FIG. 1. Hay diferencias significativas en las secuencias de aminoácidos codificadas por el gen de 20P1F12-GTC1/TMPRSS2 en comparación con la secuencia de TMPRSS2 previamente informada (véase el alineamiento de aminoácidos en la FIG. 3). Por ejemplo, cuatro de las diferencias de aminoácidos están en el dominio de proteasa, tres de las cuales son diferencias de aminoácidos no conservativas y que podrían afectar la función de la proteasa y/o la especificidad. La novedosa proteína 20P1F12/TMPRSS2 de los solicitantes se ha caracterizado en gran parte como se ha descrito adicionalmente en las secciones de ejemplos en este documento. La proteína 20P1F12/TMPRSS2 es una proteína

transmembrana de tipo II glicosilada con un dominio de proteasa extracelular en el extremo C. El gen 20P1F12/TMPRSS2 está regulado por andrógenos. La proteína 20P1F12/TMPRSS2 se expresa sobre la superficie celular. La expresión del gen de 20P1F12/TMPRSS2 en tejidos normales es específica de la próstata. La expresión de 20P1F12/TMPRSS2 también se observa en cáncer de próstata, que incluye expresión de alto nivel en enfermedad avanzada y metastásica. Además, parece que 20P1F12 está expresado en exceso en cáncer de colon y también puede expresarse en otros cánceres.

Además de las diferencias en la estructura entre el gen 20P1F12-GTC1/TMPRSS2 del solicitante (FIG. 1) y la secuencia previamente informada (FIG. 2), los resultados del análisis de expresión del solicitante son contrarios a los informados por Paoloni-Giacobino y col. En particular, el análisis de expresión del solicitante del gen 20P1F12/TMPRSS2 por RT-PCR en 16 tejidos normales muestra la expresión de mayor nivel en próstata, detectándose niveles sustancialmente menores en colon, páncreas, riñón, hígado y pulmón y expresión no detectable en intestino delgado (FIG. 5, Paneles B y C). Se obtuvieron resultados similares en el análisis de transferencia Northern, aunque el nivel de expresión detectado en próstata por la transferencia Northern es extremadamente alto con respecto a estos otros tejidos en los que sólo se detecta expresión de muy bajo nivel (FIG. 6, Paneles A y B).

El análisis de expresión también muestra expresión de alto nivel de 20P1F12/TMPRSS2 en todos los xenoinjertos de cáncer de próstata probados, a aproximadamente los mismos niveles observados en próstata normal (FIG. 5, Panel A). El análisis de transferencia Northern muestra resultados similares, detectándose expresión de nivel algo más bajo en el xenoinjerto de LAPC-9 con respecto a los xenoinjertos de LAPC-4 y próstata normal; la expresión también se detecta en algunas de las líneas celulares de cáncer de próstata analizadas (FIG. 6, Panel C). El gen 20P1F12/TMPRSS2 también se expresa en varias líneas celulares de cáncer de próstata (FIG. 7). Estos resultados indican que el gen 20P1F12/TMPRSS2 es principalmente un gen específico de la próstata que puede participar en el desarrollo y/o la progresión de cáncer de próstata. Además, la expresión de alto nivel de 20P1F12/TMPRSS2 se detectó por transferencia Northern en varias líneas celulares de carcinoma de colon (FIG. 6, Panel C; FIG. 7). La expresión de 20P1F12/TMPRSS2 en cáncer de colon puede proporcionar una base molecular para detectar, diagnosticar, pronosticar y/o tratar cáncer de colon.

Por tanto, la invención proporciona un gen (y proteína) 20P1F12/TMPRSS2 único y útil que tiene las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos codificados que se muestran en la FIG. 1. Se proporcionan sondas de nucleótidos correspondientes a todas o parte de las secuencias de ADNc de 20P1F12/TMPRSS2 desveladas en este documento (FIGS. 1 y 4) y pueden usarse para aislar o identificar otros ADNc que codifican toda o parte de la secuencia del gen 20P1F12/TMPRSS2. La invención proporcionó adicionalmente cebadores que pueden amplificar específicamente el gen 20P1F12/TMPRSS2 o sus transcritos de ARN. La invención proporciona además polinucleótidos aislados que contienen secuencias codificantes del (de los) producto(s) génico(s) de 20P1F12/TMPRSS2. Tales polinucleótidos pueden usarse para expresar proteínas y péptidos codificados por 20P1F12/TMPRSS2 que tienen varios usos adicionales. También pueden usarse sondas y cebadores del gen 20P1F12/TMPRSS2 para detectar la presencia o la ausencia de ARNm de 20P1F12/TMPRSS2 en diversas muestras biológicas, para detectar células de cáncer de próstata y otras células que expresan 20P1F12/TMPRSS2, para generar vacunas contra tumores, y en ensayos de diagnóstico y de pronóstico molecular para cáncer de próstata. Los polinucleótidos correspondientes o complementarios al gen 20P1F12/TMPRSS2 pueden ser útiles en procedimientos para tratar cáncer de próstata tales como, por ejemplo, en la modulación o la inhibición de la actividad biológica de 20P1F12/TMPRSS2.

Más específicamente, un polinucleótido 20P1F12/TMPRSS2 útil en la práctica de la invención puede comprender un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de 20P1F12/TMPRSS2 humano como se muestra en la FIG. 1 (SEQ ID NO. XX) o la secuencia de nucleótidos del TMPRSS2 previamente informado como se muestra en la FIG. 2 (SEQ ID NO: XX), una secuencia complementaria con tanto el fragmento de polinucleótido anterior como un fragmento de polinucleótido de cualquiera de lo anterior. Otra realización comprende un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína 20P1F12/TMPRSS2 que se muestra en la FIG. 1 (SEQ ID NO. XX).

Dentro del alcance de este aspecto de la invención están incluidos ADN genómico, ADNc, ribozimas y moléculas de sentido contrario, además de moléculas de ácidos nucleicos basadas en un esqueleto alternativo o que incluyen bases alternativas, si se derivan de fuentes naturales o sintetizadas. Por ejemplo, las moléculas de sentido contrario pueden ser ARN u otras moléculas que incluyen ácidos nucleicos de péptidos (PNA) o moléculas de no ácidos nucleicos tales como derivados de fosforotioato que se unen específicamente a ADN o ARN en un modo dependiente del par de bases. Un experto puede obtener fácilmente estas clases de moléculas de ácidos nucleicos usando los polinucleótidos 20P1F12/TMPRSS2 y las secuencias de polinucleótidos desveladas en este documento.

Otras realizaciones específicas de este aspecto de la invención incluyen el uso de cebadores y pares de cebadores que permiten la amplificación específica de los polinucleótidos de la invención o de cualquier parte

específica de los mismos, y sondas que se hibridan selectivamente o específicamente con moléculas de ácidos nucleicos de la invención o con cualquier parte de las mismas. Las sondas pueden marcarse con un marcador detectable tal como, por ejemplo, un radioisótopo, compuesto fluorescente, compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, quelante metálico o enzima. Tales sondas y cebadores pueden usarse para detectar la presencia de un polinucleótido 20P1F12/TMPRSS2 en una muestra y como medio para detectar una célula que expresa una proteína 20P1F12/TMPRSS2. Un ejemplo de una sonda tal es un polipéptido que comprende toda o parte de la secuencia de ADNc de 20P1F12/TMPRSS2 humana mostrada en la FIG. 1 (SEQ ID NO. XX). En los siguientes ejemplos también se describen ejemplos de pares de cebadores que pueden amplificar específicamente ARNm de 20P1F12/TMPRSS2. Como entenderá el experto, puede prepararse un gran número de cebadores y sondas diferentes basándose en las secuencias proporcionadas en este documento y usarse eficazmente para amplificar y/o detectar un ARNm de 20P1F12/TMPRSS2.

Los polinucleótidos 20P1F12/TMPRSS2 de la invención son útiles para una variedad de fines que incluyen, pero no se limitan a, su uso como sondas y cebadores para la amplificación y/o detección del gen 20P1F12/TMPRSS2, ARNm o fragmentos del mismo; como reactivos para el diagnóstico y/o el pronóstico de cáncer de próstata y de colon; como secuencias codificantes que pueden dirigir la expresión de polipéptidos 20P1F12/TMPRSS2; como herramientas para modular o inhibir la expresión del gen 20P1F12/TMPRSS2 y/o la traducción del transcrito de 20P1F12/TMPRSS2; y como agentes terapéuticos.

La invención también proporciona proteínas y polipéptidos 20P1F12/TMPRSS2 que pueden usarse, por ejemplo, para generar anticuerpos o para uso como vacunas contra el cáncer. Los anticuerpos que pueden unirse específicamente a e identificar proteínas o polipéptidos 20P1F12/TMPRSS2 pueden usarse para detectar la expresión de 20P1F12/TMPRSS2, determinar su localización subcelular, detectar y obtener imágenes de células de cáncer de próstata y tumores de próstata, y modular o inhibir la actividad biológica de 20P1F12/TMPRSS2. Los anticuerpos también pueden usarse terapéuticamente como se describe adicionalmente más abajo. Los procedimientos para la generación de anticuerpos policlonales y monoclonales son muy conocidos en la técnica.

La invención también proporciona moléculas de ADN o ARN recombinante que contienen un polinucleótido 20P1F12/TMPRSS2 que incluye, pero no se limita a, fagos, plásmidos, fagémidos, cósmidos, YAC, BAC, además de diversos vectores víricos y no víricos muy conocidos en la técnica, y células transformadas o transfectadas con tales moléculas de ADN o ARN recombinantes. Como se usa en este documento, una molécula de ADN o ARN recombinante es una molécula de ADN o ARN que ha sido sometida a manipulación molecular *in vitro*. Los procedimientos para generar tales moléculas son muy conocidos (véase, por ejemplo, Sambrook y col., 1989, anteriormente).

La invención proporciona además un sistema de vectores huésped que comprende una molécula de ADN recombinante que contiene un polinucleótido 20P1F12/TMPRSS2 dentro de una célula huésped procariota o eucariota adecuada. Ejemplos de células huésped eucariotas adecuadas incluyen una célula de levadura, una célula de planta o una célula animal tal como una célula de mamífero o una célula de insecto (por ejemplo, una célula infectable por baculovirus tal como una célula Sf9). Ejemplos de células de mamífero adecuadas incluyen diversas líneas celulares de cáncer de próstata tales como LnCaP, PC-3, DU145, LAPC-4, TsuPr1, otras líneas celulares de cáncer de próstata transfectables o transducibles, además de varias células de mamífero usadas rutinariamente para la expresión de proteínas recombinantes (por ejemplo, células COS, CHO, 293, 293T). Más particularmente, un polinucleótido que comprende la secuencia codificante de un 20P1F12/TMPRSS2 puede usarse para generar proteínas 20P1F12/TMPRSS2 o fragmentos de las mismas usando cualquier número de sistemas de vectores huésped usados rutinariamente y ampliamente conocidos en la técnica.

Está disponible una amplia gama de sistemas de vectores huésped adecuados para la expresión de proteínas 20P1F12/TMPRSS2 o fragmentos de las mismas (véase, por ejemplo, Sambrook y col., 1989, anteriormente; Current Protocols in Molecular Biology, 1995, anteriormente). Los vectores preferidos para la expresión en mamíferos incluyen, pero no se limitan a, marca de pcDNA 3.1/myc-His (Invitrogen) y el vector retroviral pSRatKneo (Muller y col., 1991, MCB 11:1785). Usando estos vectores de expresión, 20P1F12/TMPRSS2 puede expresarse preferentemente en varias líneas celulares de cáncer de próstata y de no próstata que incluyen, por ejemplo 3T3, 293, 293TPC-3, LNCaP y TsuPr1. Los sistemas de vectores huésped de la invención son útiles para la producción de una proteína 20P1F12/TMPRSS2 o fragmento de la misma. Tales sistemas de vectores huésped pueden emplearse para estudiar las propiedades funcionales de mutaciones de 20P1F12/TMPRSS2 y 20P1F12/TMPRSS2.

Las proteínas codificadas por los genes 20P1F12/TMPRSS2, o por fragmentos de los mismos, tendrán una variedad de usos que incluyen, pero no se limitan a, la generación de anticuerpos y en procedimientos para identificar ligandos y otros agentes y constituyentes celulares que se unen a un producto génico de 20P1F12/TMPRSS2. Tales proteínas también pueden usarse como vacunas contra el cáncer. Los anticuerpos producidos contra una proteína 20P1F12/TMPRSS2 o fragmento de la misma pueden ser útiles en ensayos de diagnóstico y de pronóstico, metodologías de obtención de imágenes (incluyendo, particularmente, la obtención de

imágenes del cáncer) y procedimientos terapéuticos en el control de cánceres humanos caracterizados por la expresión de una proteína 20P1F12/TMPRSS2 tales como cánceres de próstata y de colon. Se contemplan diversos ensayos inmunológicos útiles para la detección de proteínas 20P1F12/TMPRSS2 que incluyen, pero no se limitan a, diversos tipos de radioinmunoensayos, enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), ensayos inmunofluorescentes ligados a enzima (ELIFA), procedimientos inmunocitoquímicos y similares. Tales anticuerpos pueden marcarse y usarse como reactivos de obtención de imágenes inmunológicas que pueden detectar células de próstata (por ejemplo, en procedimientos de obtención de imágenes radioescintigráficas).

En una realización específica, una proteína 20P1F12/TMPRSS2 novedosa que tiene la secuencia de aminoácidos de 20P1F12/TMPRSS2 humana se proporciona en la FIG. 1 (SEQ ID NO. XX). También se contemplan proteínas de fusión que combinan todas o parte de 20P1F12/TMPRSS2 con un polipéptido heterólogo. La proteína 20P1F12/TMPRSS2 de la invención puede realizarse de muchas formas, preferentemente en forma aislada. Como se usa en este documento, se dice que la proteína está "aislada" cuando se emplean procedimientos físicos, mecánicos o químicos para eliminar la proteína 20P1F12/TMPRSS2 de constituyentes celulares que normalmente están asociados a la proteína. Un experto puede emplear fácilmente procedimientos de purificación convencionales para obtener una proteína 20P1F12/TMPRSS2 aislada. Una molécula de proteína 20P1F12/TMPRSS2 purificada estará sustancialmente libre de otras proteínas o moléculas que afecten la unión de 20P1F12/TMPRSS2 al anticuerpo u otro ligando. La naturaleza y el grado de aislamiento y purificación dependerán del uso previsto. Las realizaciones de una proteína 20P1F12/TMPRSS2 incluyen una proteína 20P1F12/TMPRSS2 purificada y una proteína 20P1F12/TMPRSS2 soluble funcional. En una forma, tales proteínas 20P1F12/TMPRSS2 solubles funcionales o fragmentos de las mismas conservan la capacidad para unirse al anticuerpo u otro ligando.

Pueden usarse procedimientos recombinantes para generar moléculas de ácidos nucleicos que codifican la proteína 20P1F12/TMPRSS2. A este respecto, las moléculas de ácidos nucleicos que codifican 20P1F12/TMPRSS2 descritas en este documento proporcionan medios para generar fragmentos definidos de la proteína 20P1F12/TMPRSS2. Tales polipéptidos 20P1F12/TMPRSS2 son particularmente útiles en la generación de anticuerpos específicos de dominio (por ejemplo, anticuerpos que reconocen un epítipo extracelular de la proteína 20P1F12/TMPRSS2), identificando agentes o factores celulares que se unen a un dominio de 20P1F12/TMPRSS2 particular, y en diversos contextos terapéuticos que incluyen, pero no se limitan a, vacunas contra el cáncer. Los polipéptidos 20P1F12/TMPRSS2 que contienen estructuras particularmente interesantes pueden predecirse y/o identificarse usando diversas técnicas analíticas muy conocidas en la técnica que incluyen, por ejemplo, los procedimientos de análisis de Chou-Fasman, Garnier-Robson, Kyte-Doolittle, Eisenberg, Karplus-Schultz o Jameson-Wolf, o basados en inmunogenicidad.

En este documento también se describen anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a la proteína 20P1F12/TMPRSS2 y fragmentos de polipéptidos de la misma. Los anticuerpos más preferidos se unirán selectivamente a una proteína 20P1F12/TMPRSS2 y no se unirán (o se unirán débilmente) a proteínas y polipéptidos no 20P1F12/TMPRSS2. Los anticuerpos dirigidos contra 20P1F12/TMPRSS2 que son particularmente contemplados incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales, además de fragmentos que contienen el dominio de unión a antígeno y/o una o más regiones determinantes de la complementariedad de estos anticuerpos. Como se usa en este documento, un fragmento de anticuerpo se define como al menos una parte de la región variable de la molécula de inmunoglobulina que se une a su diana, es decir, la región de unión a antígeno.

Para algunas solicitudes puede desearse generar anticuerpos que reaccionen específicamente con una proteína 20P1F12/TMPRSS2 particular y/o un epítipo dentro de un dominio estructural particular. Por ejemplo, anticuerpos preferidos útiles para fines de obtención de imágenes de diagnóstico de cáncer son aquellas con reacción con un epítipo en una región extracelular de la proteína 20P1F12/TMPRSS2 como se expresa en células cancerosas. Tales anticuerpos pueden generarse usando la proteína 20P1F12/TMPRSS2, o usando péptidos derivados de los dominios extracelulares predichos u otros de 20P1F12/TMPRSS2, y usados como un inmunógeno.

Los anticuerpos 20P1F12/TMPRSS2 descritos en este documento pueden ser particularmente útiles en ensayos de diagnóstico y de pronóstico de cáncer de próstata y de colon, metodologías de obtención de imágenes y estrategias terapéuticas. La invención proporciona diversos ensayos inmunológicos útiles para la detección y la cuantificación de 20P1F12/TMPRSS2. Tales ensayos comprenden generalmente uno o más anticuerpos 20P1F12/TMPRSS2 que pueden reconocer y unirse a 20P1F12/TMPRSS2, y pueden realizarse dentro de diversos formatos de ensayos inmunológicos muy conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, diversos tipos de radioinmunoensayos, enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), ensayos inmunofluorescentes ligados a enzima (ELIFA) y similares. Además, la invención también proporciona procedimientos de obtención de imágenes inmunológicas que pueden detectar cáncer de próstata que incluyen, pero limitados a, procedimientos de obtención de imágenes radioescintigráficas usando anticuerpos 20P1F12/TMPRSS2 marcados. Tales ensayos pueden ser clínicamente útiles en la detección, monitorización y el pronóstico de cáncer de próstata, particularmente cáncer de próstata avanzado.

Los anticuerpos 20P1F12/TMPRSS2 también pueden usarse en procedimientos para purificar proteínas y

polipéptidos 20P1F12/TMPRSS2 y para aislar homólogos de 20P1F12/TMPRSS2 y moléculas relacionadas. Por ejemplo, en una realización, el procedimiento de purificación de una proteína 20P1F12/TMPRSS2 comprende incubar un anticuerpo 20P1F12/TMPRSS2, que se ha acoplado a una matriz sólida, con un lisado u otra disolución que contiene 20P1F12/TMPRSS2 en condiciones que permitan que el anticuerpo 20P1F12/TMPRSS2 se una a 20P1F12/TMPRSS2; lavar la matriz sólida para eliminar impurezas; y eluir 20P1F12/TMPRSS2 del anticuerpo acoplado. Otros usos de los anticuerpos 20P1F12/TMPRSS2 descritos en este documento incluyen generar anticuerpos antiidiotípicos que imitan a la proteína 20P1F12/TMPRSS2.

Los anticuerpos 20P1F12/TMPRSS2 también pueden usarse terapéuticamente, por ejemplo, modulando o inhibiendo la actividad biológica de una proteína 20P1F12/TMPRSS2 o eligiendo como diana y destruyendo células de cáncer de próstata que expresan una proteína 20P1F12/TMPRSS2. La terapia con anticuerpos de cáncer de próstata y de colon se describe en mayor detalle más adelante.

En la técnica son muy conocidos diversos procedimientos para la preparación de anticuerpos. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos inmunizando un huésped de mamífero adecuado usando una proteína 20P1F12/TMPRSS2, péptido o fragmento, en forma aislada o inmunoconjugada (Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press, Eds., Harlow y Lane (1988); Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press, NY (1989)). Además, también pueden usarse proteínas de fusión 20P1F12/TMPRSS2 tales como una proteína de fusión de GST de 20P1F12/TMPRSS2. En una realización particular puede producirse una proteína de fusión de GST que comprende toda o la mayoría de la secuencia de aminoácidos del marco de lectura abierto de la FIG. 1 y usarse como un inmunógeno para generar anticuerpos apropiados. Como se describe en el Ejemplo 5, una fusión de GST tal se usó para generar varios anticuerpos monoclonales que reaccionan inmuno-específicamente con 20P1F12/TMPRSS2. Las células que expresan o expresan en exceso 20P1F12/TMPRSS2 también pueden usarse para inmunizaciones. Similarmente, puede usarse cualquier célula manipulada para expresar 20P1F12/TMPRSS2. Esta estrategia puede producir la producción de anticuerpos monoclonales con capacidades potenciadas para el reconocimiento de 20P1F12/TMPRSS2 endógeno. Las estrategias adicionales para generar anticuerpos 20P1F12/TMPRSS2 se describen en el Ejemplo 5 en este documento.

La secuencia de aminoácidos de 20P1F12/TMPRSS2 como se muestra en la FIG. 1 (SEQ ID NO. XX) puede usarse para seleccionar regiones específicas de la proteína 20P1F12/TMPRSS2 para generar anticuerpos. Por ejemplo, pueden usarse análisis de hidrofobia e hidrofilia de la secuencia de aminoácidos de 20P1F12/TMPRSS2 para identificar regiones hidrófilas en la estructura de 20P1F12/TMPRSS2. Las regiones de la proteína 20P1F12/TMPRSS2 que muestran estructura inmunogénica, además de otras regiones y dominios, pueden identificarse fácilmente usando diversos otros procedimientos conocidos en la técnica tales como análisis de Chou-Fasman, Garnier-Robson, Kyte-Doolittle, Eisenberg, Karplus-Schultz o Jameson-Wolf.

Los procedimientos para preparar una proteína o polipéptido para uso como inmunógeno y para preparar conjugados inmunogénicos de una proteína con un vehículo tal como BSA, KLH u otras proteínas portadoras son muy conocidos en la técnica. En algunas circunstancias puede usarse la conjugación directa usando, por ejemplo, reactivos de carbodiimida; en otros casos pueden ser eficaces reactivos de unión tales como aquellos suministrados por Pierce Chemical Co., Rockford, IL. La administración de un inmunógeno de 20P1F12/TMPRSS2 se realiza generalmente mediante inyección durante un periodo de tiempo adecuado y usando un adyuvante adecuado como generalmente se entiende en la materia. Durante el programa inmunización pueden tomarse títulos de anticuerpos para determinar la adecuación de la formación de anticuerpos.

Se prefieren anticuerpos monoclonales dirigidos contra 20P1F12/TMPRSS2 y pueden producirse por diversos medios muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse líneas celulares inmortalizadas que secretan un anticuerpo monoclonal deseado usando el procedimiento convencional de Kohler y Milstein o modificaciones que efectúan la inmortalización de linfocitos o células del bazo, como generalmente se conoce. Las líneas celulares inmortalizadas que secretan los anticuerpos deseados se criban por inmunoensayo en el que el antígeno es la proteína 20P1F12/TMPRSS2 o el fragmento de 20P1F12/TMPRSS2. Cuando se identifica el cultivo celular inmortalizado apropiado que secreta el anticuerpo deseado, las células pueden expandirse y los anticuerpos se producen tanto a partir de cultivos *in vitro* como de fluido ascítico.

Los anticuerpos o fragmentos también pueden producirse usando tecnología actual mediante medios recombinantes. Las regiones que se unen específicamente a las regiones deseadas de la proteína 20P1F12/TMPRSS2 también pueden producirse en el contexto de anticuerpos quiméricos o injertados con CDR de múltiple origen de especies. También pueden producirse anticuerpos 20P1F12/TMPRSS2 humanizados o humanos y se prefieren. Se conocen diversas soluciones para producir tales anticuerpos humanizados, e incluyen procedimientos quiméricos y de injerto de CDR; procedimientos para producir anticuerpos monoclonales completamente humanos incluyen la expresión en fago y procedimientos transgénicos (para una revisión véase Vaughan y col., 1998, Nature Biotechnology 16: 535-539).

Los anticuerpos monoclonales 20P1F12/TMPRSS2 completamente humanos pueden generarse usando tecnologías de clonación que emplean grandes bibliotecas combinatorias de genes de Ig humana (es decir,

expresión en fago) (Griffiths y Hoogenboom, Building an in vitro immune system: human antibodies from phage display libraries. En: Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications in Man. Clark, M. (Ed.), Nottingham Academic, páginas 45-64 (1993); Burton y Barbas, Human Antibodies from combinatorial libraries. Id., páginas 65-82). Los anticuerpos monoclonales 20P1F12/TMPRSS2 completamente humanos también pueden producirse usando ratones transgénicos manipulados para contener locus del gen de inmunoglobulina humana como se describe en la solicitud de patente PCT WO98/24893, Jakobovits y col., publicado el 3 de diciembre de 1997 (véase también Kucherlapati y Jakobovits, 1998, Exp. Opin. Invest. Drugs 7(4): 607-614). Este procedimiento evita la manipulación *in vitro* requerida con la tecnología de expresión en fago y produce eficientemente anticuerpos humanos auténticos con alta afinidad.

La reactividad de anticuerpos 20P1F12/TMPRSS2 con una proteína 20P1F12/TMPRSS2 puede establecerse por varios medios muy conocidos que incluyen análisis de transferencia Western, inmunoprecipitación, ELISA, y FACS usando, si es apropiado, proteínas 20P1F12/TMPRSS2, péptidos, células que expresan 20P1F12/TMPRSS2 o extractos de los mismos.

Un anticuerpo 20P1F12/TMPRSS2 o fragmento del mismo descrito en este documento puede marcarse con un marcador detectable o conjugado a una segunda molécula tal como un agente citotóxico o terapéutico, y usarse para elegir como diana una célula positiva para 20P1F12/TMPRSS2 (Vitetta, E.S. y col., 1993, Immunotoxin therapy, en DeVita, Jr., V.T. y col., eds, Cancer: Principles and Practice of Oncology, 4ª ed., J.B. Lippincott Co., Filadelfia, 2624-2636). Marcadores detectables adecuados incluyen, pero no se limitan a, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, compuesto quimioluminiscente, un quelante metálico o una enzima.

La proteína 20P1F12/TMPRSS2 es una serina-proteasa de la superficie celular que puede participar en la invasión y la metástasis de cáncer de próstata y de colon. Por consiguiente, 20P1F12/TMPRSS2 puede ser la diana ideal para la intervención terapéutica. Su dominio extracelular de proteasa puede ser una posible diana de fármaco, mientras que el dominio extracelular completo puede ser una posible diana de anticuerpo terapéutico. Por tanto, la invención proporciona diversas composiciones y procedimientos inmunoterapéuticos para tratar cáncer de próstata y de colon que incluyen terapia con anticuerpos, vacunas *in vivo* y soluciones de inmunoterapia *ex vivo* que utilizan polinucleótidos y polipéptidos correspondientes a los anticuerpos 20P1F12/TMPRSS2 y dirigidos contra 20P1F12/TMPRSS2.

En una solución, los anticuerpos dirigidos contra 20P1F12/TMPRSS2 pueden usarse para tratar cáncer de próstata. Por ejemplo, el anticuerpo dirigido contra 20P1F12/TMPRSS2 sin conjugar puede introducirse en un paciente de forma que el anticuerpo se una a 20P1F12/TMPRSS2 en células de cáncer de próstata y medie en la destrucción de las células y el tumor. El mecanismo terapéutico de acción puede incluir citólisis mediada por complemento, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, alteración de la función fisiológica de 20P1F12/TMPRSS2 y/o la inhibición de unión a ligando o rutas de transducción de señales. También pueden usarse terapéuticamente anticuerpos dirigidos contra 20P1F12/TMPRSS2 conjugados con agentes tóxicos tales como ricina, o con agentes terapéuticos, para administrar el agente tóxico o terapéutico directamente a las células de tumor de próstata que llevan 20P1F12/TMPRSS2 y así destruir el tumor.

La inmunoterapia del cáncer de próstata usando los anticuerpos dirigidos contra 20P1F12/TMPRSS2 puede seguir las enseñanzas generadas a partir de diversas soluciones que han sido empleadas satisfactoriamente con respecto a otros tipos de cáncer que incluyen, pero no se limitan a, cáncer de colon (Arlen y col., 1998, Crit Rev Immunol 18: 133-138), mieloma múltiple (Ozaki y col., 1997, Blood 90: 3179-3186; Tsunenari y col., 1997, Blood 90: 2437-2444), cáncer gástrico (Kasprzyk y col., 1992, Cancer Res 52: 2771-2776), linfoma de linfocitos B (Funakoshi y col., 1996, J Immunother Emphasis Tumor Immunol 19: 93-101), leucemia (Zhong y col., 1996, Leuk Res 20: 581-589), cáncer colorrectal (Moun y col., 1994, Cancer Res 54: 6160-6166); Velders y col., 1995, Cancer Res 55: 4398-4403) y cáncer de mama (Shepard y col., 1991, J Clin Immunol 11:117-127).

Los anticuerpos 20P1F12/TMPRSS2 pueden introducirse en un paciente de forma que el anticuerpo se una a 20P1F12/TMPRSS2 en las células cancerosas y medie en la destrucción de las células y el tumor y/o inhiba el crecimiento de las células o el tumor. Los mecanismos por los que tales anticuerpos ejercen un efecto terapéutico pueden incluir citólisis mediada por complemento, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, modulación de la función fisiológica de 20P1F12/TMPRSS2, inhibición de la unión a ligando o rutas de transducción de señales, modulación de la diferenciación de célula tumorales, alteración de los perfiles de factores de angiogénesis tumorales y/o mediante inducción de apoptosis. También pueden usarse terapéuticamente anticuerpos 20P1F12/TMPRSS2 conjugados con agentes tóxicos o terapéuticos para administrar el agente tóxico o terapéutico directamente a las células tumorales que llevan 20P1F12/TMPRSS2.

Aunque la terapia con anticuerpos 20P1F12/TMPRSS2 puede ser útil para todas las fases de los cánceres anteriores, la terapia con anticuerpos puede ser particularmente apropiada en cánceres de próstata avanzados o metastásicos. En particular, debido a que el gen 20P1F12/TMPRSS2 parece que no se regula por andrógeno, puede usarse la terapia de anticuerpos dirigidos contra 20P1F12/TMPRSS2 para tratar pacientes que están

recibiendo terapia de ablación de andrógenos. Puede preferirse combinar el procedimiento de terapia con anticuerpos de la invención con una pauta quimioterapéutica en pacientes que no han recibido tratamiento quimioterapéutico, mientras que el tratamiento con la terapia con anticuerpos de la invención puede indicarse para pacientes que han recibido una o más quimioterapias. Adicionalmente, la terapia con anticuerpos también puede permitir el uso de dosificaciones reducidas de quimioterapia concomitante, particularmente en pacientes que no toleran muy bien la toxicidad del agente quimioterapéutico.

Puede ser deseable que los pacientes se evalúen para la presencia y el nivel de 20P1F12/TMPRSS2, preferentemente usando evaluaciones inmunohistoquímicas de tejido tumoral, obtención de imágenes de 20P1F12/TMPRSS2 cuantitativas, u otras técnicas que puedan indicar de forma fidedigna la presencia y el grado de expresión. Para este fin puede preferirse el análisis inmunohistoquímico de biopsias de tumor o especímenes quirúrgicos. Los procedimientos para el análisis inmunohistoquímico de tejidos tumorales son muy conocidos en la técnica.

Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra 20P1F12/TMPRSS2 útiles en el tratamiento de cánceres de próstata incluyen aquellos que pueden iniciar una potente respuesta inmunitaria contra el tumor y aquellos que pueden dirigir la citotoxicidad. A este respecto, mAb dirigidos contra 20P1F12/TMPRSS2 pueden provocar la lisis de células tumorales por tanto mecanismos de citotoxicidad celular mediada por complemento como dependientes de anticuerpo (ADCC), requiriendo ambos una porción Fc intacta de la molécula de inmunoglobulina para la interacción con sitios de receptores Fc de células efectoras o proteínas de complemento. Además, los mAb dirigidos contra 20P1F12/TMPRSS2 que ejercen un efecto biológico directo sobre el crecimiento tumoral son útiles en la práctica de la invención. Los posibles mecanismos por los que tales mAb directamente citotóxicos pueden actuar incluyen inhibición del crecimiento celular, modulación de la diferenciación celular, modulación de los perfiles de factores de angiogénesis tumoral y la inducción de apoptosis. El mecanismo por el que un mAb dirigido contra 20P1F12/TMPRSS2 particular ejerce un efecto antitumoral puede evaluarse usando cualquier número de ensayos *in vitro* diseñados para determinar la lisis celular ADCC y mediada por complemento, además de la inhibición del crecimiento, modulación de apoptosis e inhibición de la diferenciación, y/o inhibición de la angiogénesis, como se conoce generalmente en la técnica.

La actividad antitumoral de un mAb dirigido contra 20P1F12/TMPRSS2 particular o combinación de mAb dirigidos contra 20P1F12/TMPRSS2 puede evaluarse *in vivo* usando un modelo animal adecuado. Por ejemplo, modelos de cáncer de próstata xenogénicos en los que explantes de cáncer de próstata humano o tejidos de xenoinjerto en los que se han efectuado pases se introducen en animales inmunodeprimidos tales como ratones sin pelo o con IDCG son apropiados en relación con cáncer de próstata y se han descrito (Klein y col., 1997, Nature Medicine 3: 402-408). Por ejemplo, la solicitud de patente PCT WO98/16628, Sawyers y col., publicada el 23 de abril de 1998, describe diversos modelos de xenoinjerto de cáncer de próstata humano que pueden recapitular el desarrollo de tumores primarios, micrometástasis y la formación de metástasis osteoblásticas características de enfermedad de fase tardía. La eficacia puede predecirse usando la inhibición de la formación de tumores, regresión tumoral, metástasis y similares.

Debe observarse que el uso de anticuerpos monoclonales murinos u otros no humanos, mAb quiméricos humanos/de ratón, puede inducir respuestas inmunitarias de moderadas a fuertes en algunos pacientes. En los casos más graves, una respuesta inmunitaria tal puede conducir a la extensa formación de inmunocomplejos que posiblemente pueden producir insuficiencia renal. Por consiguiente, los anticuerpos monoclonales preferidos usados en la práctica de los procedimientos terapéuticos de la invención son aquellos que son tanto completamente humanos como humanizados y que se unen específicamente al antígeno de 20P1F12/TMPRSS2 diana con alta afinidad, pero presentan baja o ninguna antigenicidad en el paciente.

El procedimiento de la invención contempla la administración de mAb dirigidos contra 20P1F12/TMPRSS2 únicos, además de combinaciones, o "mezclas" de diferentes mAb. Tales mezclas de mAb pueden tener ciertas ventajas ya que contienen mAb que explotan diferente especificidad de epítopo, diferentes mecanismos efectoras o combinan directamente mAb citotóxicos con mAb que se basan en la funcionalidad inmunoefectora. Tales mAb en combinación pueden presentar efectos terapéuticos sinérgicos. Además, la administración de mAb dirigidos contra 20P1F12/TMPRSS2 puede combinarse con otros agentes terapéuticos o radioterapia que incluyen, pero no se limitan a, diversos agentes quimioterapéuticos, bloqueadores de andrógenos e inmunomoduladores (por ejemplo, IL-2, GM-CSF). Los mAb dirigidos contra 20P1F12/TMPRSS2 pueden administrarse en su forma "desnuda" o sin conjugar, o pueden tener agentes terapéuticos o tóxicos conjugados a ellos.

Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra 20P1F12/TMPRSS2 usados en la práctica del procedimiento de la invención pueden formularse en composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo adecuado para el procedimiento de administración deseado. Los vehículos adecuados incluyen cualquier material que cuando se combina con los mAb dirigidos contra 20P1F12/TMPRSS2 conserva la especificidad y la función antitumoral del anticuerpo y no es reactivo con los sistemas inmunitarios del sujeto. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, distintos vehículos farmacéuticos convencionales tales como soluciones salinas tamponadas con fosfato

estériles, agua bacteriostática y similares.

Las formulaciones de anticuerpos dirigidos contra 20P1F12/TMPRSS2 pueden administrarse mediante cualquier vía que pueda administrar los anticuerpos al sitio de tumor. Las vías de administración posiblemente eficaces incluyen, pero no se limitan a, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intratumoral, intradérmica y similares. La vía de administración preferida es mediante inyección intravenosa. Una formulación preferida para inyección intravenosa comprende los mAb dirigidos contra 20P1F12/TMPRSS2 en una disolución de agua bacteriostática con conservante, agua estéril sin conservante y/o diluida en bolsas de poli(cloruro de vinilo) o polietileno que contienen cloruro sódico estéril al 0,9% para inyección, USP. La preparación de mAb dirigidos contra 20P1F12/TMPRSS2 puede liofilizarse y guardarse como un polvo estéril, preferentemente a vacío, y luego reconstituirse en agua bacteriostática que contiene, por ejemplo, conservante de alcohol bencílico, o en agua estéril antes de inyección.

El tratamiento implicará generalmente la administración repetida de la preparación de anticuerpos dirigidos contra 20P1F12/TMPRSS2 mediante una vía de administración aceptable tal como inyección intravenosa (IV), normalmente a una dosis en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal. Las dosis en el intervalo de 10-500 mg de mAb por semana pueden ser eficaces y son bien toleradas. Basándose en la experiencia clínica con el mAb Herceptina en el tratamiento de cáncer de mama metastásico, una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg de peso corporal del paciente IV seguido de dosis semanales de aproximadamente 2 mg/kg IV de la preparación de los mAb dirigidos contra 20P1F12/TMPRSS2 puede representar una pauta de dosificación aceptable. Preferentemente, la dosis de carga inicial se administra como una infusión de 90 minutos o más larga. La dosis de mantenimiento periódico puede administrarse como una infusión de 30 minutos o más larga, siempre que la dosis inicial fuera bien tolerada. Sin embargo, como entenderá un experto en la materia, diversos factores influirán en la pauta de dosis ideal en un caso particular. Tales factores pueden incluir, por ejemplo, la afinidad de unión y la semivida de el mAb o los mAb usados, el grado de expresión en exceso de 20P1F12/TMPRSS2 en el paciente, el grado de antígeno de 20P1F12/TMPRSS2 propagado en circulación, el nivel de concentración de anticuerpo en estado estacionario deseado, la frecuencia de tratamiento y la influencia de agentes quimioterapéuticos usados en combinación con el procedimiento de tratamiento de la invención.

Óptimamente, los pacientes deberían evaluarse para el nivel de antígeno de 20P1F12/TMPRSS2 propagado en circulación en suero con el fin de ayudar en la determinación de la pauta de dosificación más eficaz y factores relacionados. Tales evaluaciones también pueden usarse para monitorizar fines mediante terapia, y pueden ser útiles para calcular el éxito terapéutico en combinación con la evaluación de otros parámetros (tales como niveles de PSA en suero en terapia contra el cáncer de próstata).

Los inventores también han descrito vacunas contra el cáncer de próstata que comprenden una proteína 20P1F12/TMPRSS2 o fragmento de la misma. El uso de un antígeno tumoral en una vacuna para generar inmunidad humoral y mediada por células para uso en terapia contra el cáncer es muy conocido en la técnica y se ha empleado en cáncer de próstata usando PSMA humano e inmunógenos de PAP de roedor (Hodge y col., 1995, Int. J. Cancer 63: 231-237; Fong y col., 1997, J. Immunol. 159: 3113-3117). Tales procedimientos pueden ponerse fácilmente en práctica empleando una proteína 20P1F12/TMPRSS2, o fragmento de la misma, o una molécula de ácido nucleico que codifica 20P1F12/TMPRSS2 y vectores recombinantes que pueden expresar y presentar apropiadamente el inmunógeno de 20P1F12/TMPRSS2.

Por ejemplo, pueden usarse sistemas de administración de genes víricos para administrar una molécula de ácido nucleico que codifica 20P1F12/TMPRSS2. Diversos sistemas de administración de genes víricos que pueden usarse en la práctica de este aspecto de la invención incluyen, pero no se limitan a, variolovacuna, viruela aviar, virus de la viruela del canario, adenovirus, virus de la gripe, virus de la poliomiелitis, virus adenoasociado, lentivirus y virus de Sindbis (Restifo, 1996, Curr. Opin. Immunol. 8: 658-663). También pueden emplearse sistemas de administración no víricos usando ADN desnudo que codifica una proteína 20P1F12/TMPRSS2 o fragmento de la misma introducido en el paciente (por ejemplo, intramuscularmente) para inducir una respuesta antitumoral. En una realización puede emplearse ADNc de 20P1F12/TMPRSS2 humano de longitud completa. En otra realización pueden emplearse moléculas de ácidos nucleicos de 20P1F12/TMPRSS2 que codifican epítopes de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos. Los epítopes CTL pueden determinarse usando algoritmos específicos (por ejemplo, Epimer, Brown University) para identificar péptidos dentro de una proteína 20P1F12/TMPRSS2 que pueden unirse óptimamente a alelos HLA especificados.

También pueden emplearse diversas estrategias *ex vivo*. Una solución implica el uso de células dendríticas para presentar el antígeno de 20P1F12/TMPRSS2 a un sistema inmunitario del paciente. Las células dendríticas expresan la clase I y II de MHC, el coestimulador B7 y IL-12 y, por tanto, son células presentadoras de antígeno altamente especializadas. En cáncer de próstata se están usando células dendríticas autólogas pulsadas con péptidos del antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA) en un ensayo clínico de fase I para estimular sistema inmunitarios de pacientes con cáncer de próstata (Tjoa y col., 1996, Prostate 28: 65-69; Murphy y col., 1996, Prostate 29: 371-380). Las células dendríticas pueden usarse para presentar péptidos

20P1F12/TMPRSS2 a linfocitos T en el contexto de moléculas de la clase I y II de MHC. En una realización, las células dendríticas autólogas se pulsan con péptidos 20P1F12/TMPRSS2 que pueden unirse a moléculas de MHC. En otra realización, las células dendríticas se pulsan con la proteína 20P1F12/TMPRSS2 completa. Todavía otra realización implica manipular la expresión en exceso del gen 20P1F12/TMPRSS2 en células dendríticas usando diversos vectores de implementación conocidos en la técnica tales como adenovirus (Arthur y col., 1997, Cancer Gene Ther. 4: 17-25), retrovirus (Henderson y col., 1996, Cancer Res. 56: 3763-3770), lentivirus, virus adenoasociado, transfección de ADN (Ribas y col., 1997, Cancer Res. 57: 2865-2869) y transfección de ARN derivado de tumor (Ashley y col., 1997, J. Exp. Med. 186: 1177-1182).

También pueden usarse anticuerpos antiidiotípicos dirigidos contra 20P1F12/TMPRSS2 en terapia contra el cáncer como vacuna para inducir una respuesta inmunitaria a células que expresan una proteína 20P1F12/TMPRSS2. Específicamente, la generación de anticuerpos antiidiotípicos es muy conocida en la técnica y puede adaptarse fácilmente para generar anticuerpos antiidiotípicos dirigidos contra 20P1F12/TMPRSS2 que imitan un epítipo en una proteína 20P1F12/TMPRSS2 (véase, por ejemplo, Wagner y col., 1997, Hybridoma 16: 33-40; Foon y col., 1995, J Clin Invest 96: 334-342; Herlyn y col., 1996, Cancer Immunol Immunother 43: 65-76). Un anticuerpo antiidiotípico tal puede usarse en terapia antiidiotípica como se ha puesto actualmente en práctica con otros anticuerpos antiidiotípicos dirigidos contra antígenos de tumor.

Pueden emplearse procedimientos de inmunización genética para generar respuestas inmunitarias humorales y celulares profilácticas o terapéuticas dirigidas contra células cancerosas que expresan 20P1F12/TMPRSS2, particularmente células de cáncer de colon y de próstata. Los constructos que comprenden ADN que codifican una proteína/inmunógeno 20P1F12/TMPRSS2 y secuencias reguladoras apropiadas pueden inyectarse directamente en el músculo o la piel de un individuo, de forma que las células del músculo o la piel capten el constructo y expresen la proteína/inmunógeno 20P1F12/TMPRSS2 codificado. La proteína/inmunógeno 20P1F12/TMPRSS2 puede expresarse como una proteína de la superficie celular o secretarse. La expresión de la proteína/inmunógeno 20P1F12/TMPRSS2 produce la generación de inmunidad humoral y celular profiláctica o terapéutica contra cáncer de próstata. Pueden usarse diversas técnicas de inmunización genética profilácticas y terapéuticas conocidas en la técnica (para una revisión véase la información y las referencias publicadas en la dirección de internet www.genweb.com).

Otro aspecto de la invención se refiere a los procedimientos de diagnóstico molecular y de obtención de imágenes de diagnóstico y que utilizan los polinucleótidos y anticuerpos 20P1F12/TMPRSS2 descritos en este documento. El perfil de expresión y la localización en la superficie celular de 20P1F12/TMPRSS2 hace que sea un posible reactivo de obtención de imágenes para enfermedad metastatizada. 20P1F12/TMPRSS2 se expresa en diversos tejidos y líneas celulares de xenoinjertos de cáncer de próstata, y también se expresa en algunas líneas celulares de cáncer de colon. El estado de expresión de 20P1F12/TMPRSS2 puede proporcionar información útil para la localización de tumores, prediciendo la susceptibilidad a enfermedad de fase avanzada, y/o calcular la agresividad del tumor. El estado de expresión de 20P1F12/TMPRSS2 en muestras de paciente puede analizarse por, por ejemplo: (i) análisis inmunohistoquímico, (ii) hibridación *in situ*, (iii) análisis por RT-PCR en muestras microdisecionadas por captura láser, (iv) análisis de transferencia Western de muestras clínicas y líneas celulares, (v) análisis de matrices de tejido, (vi) obtención de imágenes *in vivo*. Se contemplan diversos ensayos inmunológicos útiles para la detección de proteínas 20P1F12/TMPRSS2 que incluyen, pero no se limitan a, diversos tipos de radioinmunoensayos, enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA), ensayos inmunofluorescentes ligados a enzima (ELIFA), procedimientos inmunocitoquímicos y similares. Como ejemplo, anticuerpos 20P1F12/TMPRSS2 pueden marcarse y usarse como reactivos de obtención de imágenes inmunológicas que pueden detectar células de cáncer de próstata y de colon (por ejemplo, en procedimientos de obtención de imágenes radioescintigráficas). Para la obtención de imágenes radioescintigráficas *in vivo* se prefieren anticuerpos 20P1F12/TMPRSS2 radiomarcados específicamente reactivos con epítopos extracelulares de 20P1F12/TMPRSS2.

Los ensayos para identificar células de próstata, de cáncer de próstata o de cáncer de colon comprenden detectar polinucleótidos correspondientes al gen 20P1F12/TMPRSS2 en una muestra biológica tal como suero, hueso, próstata, colon y otros tejidos, orina, semen, preparaciones de célula y similares. Los polinucleótidos 20P1F12/TMPRSS2 detectables incluyen, por ejemplo, un gen 20P1F12/TMPRSS2 o fragmentos del mismo, ARNm de 20P1F12/TMPRSS2, ARNm de 20P1F12/TMPRSS2 de variantes de corte y empalme alternativas y moléculas de ADN o ARN recombinantes que contienen un polinucleótido 20P1F12/TMPRSS2. Varios procedimientos para amplificar y/o detectar la presencia del polinucleótidos 20P1F12/TMPRSS2 son muy conocidos en la técnica y pueden emplearse en la práctica de este aspecto de la invención.

En una realización, un procedimiento para detectar un ARNm de 20P1F12/TMPRSS2 en una muestra biológica comprende producir ADNc a partir de la muestra por transcripción inversa usando al menos un cebador; amplificar el ADNc así producido usando polinucleótidos 20P1F12/TMPRSS2 como cebadores de sentido directo y de sentido contrario para amplificar ADNc de 20P1F12/TMPRSS2 en su interior; y detectar la presencia del ADNc de 20P1F12/TMPRSS2 amplificado. En otra realización, un procedimiento de detección de un gen de 20P1F12/TMPRSS2 en una muestra biológica comprende aislar primero ADN genómico de la muestra; amplificar el

ADN genómico aislado usando polinucleótidos 20P1F12/TMPRSS2 como cebadores de sentido directo y de sentido contrario para amplificar el gen de 20P1F12/TMPRSS2 en su interior; y detectar la presencia del 20P1F12/TMPRSS2 amplificado. Puede diseñarse cualquier número de combinaciones de sondas de sentido directo y de sentido contrario apropiadas a partir de la secuencia de nucleótidos proporcionada para 20P1F12/TMPRSS2 (FIG. 1; SEQ ID NO. XX) y usada para este fin.

En otra realización, un procedimiento de detectar la presencia de una proteína 20P1F12/TMPRSS2 en una muestra biológica comprende primero poner en contacto la muestra con un anticuerpo 20P1F12/TMPRSS2, un fragmento reactivo con 20P1F12/TMPRSS2 del mismo o una proteína recombinante que contiene una región de unión a antígeno de un anticuerpo 20P1F12/TMPRSS2; y entonces detectar la unión de la proteína 20P1F12/TMPRSS2 en la muestra al mismo.

También se proporcionan procedimientos para identificar una célula que expresa 20P1F12/TMPRSS2. En una realización, un ensayo para identificar una célula que expresa un gen 20P1F12/TMPRSS2 comprende detectar la presencia de ARNm de 20P1F12/TMPRSS2 en la célula. Los procedimientos para la detección de ARNm particulares en células son muy conocidos e incluyen, por ejemplo, ensayos de hibridación usando sondas de ADN complementario (tales como hibridación *in situ* usando ribosondas de 20P1F12/TMPRSS2 marcadas, transferencia Northern y técnicas relacionadas) y diversos ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (tales como RT-PCR usando cebadores complementarios específicos para 20P1F12/TMPRSS2, y otros procedimientos de detección de tipo amplificación tales como, por ejemplo, ADN ramificado, SISBA, TMA y similares). Alternativamente, un ensayo para identificar una célula que expresa un gen 20P1F12/TMPRSS2 comprende detectar la presencia de la proteína 20P1F12/TMPRSS2 en la célula o secretada por la célula. Diversos procedimientos para la detección de proteínas son muy conocidos en la técnica y pueden emplearse para la detección de proteínas 20P1F12/TMPRSS2 y células que expresan 20P1F12/TMPRSS2.

La determinación del estado de patrones de expresión de 20P1F12/TMPRSS2 en un individuo puede usarse para diagnosticar cáncer y puede proporcionar información de pronóstico útil en la definición de opciones terapéuticas apropiadas. Similarmente, el estado de expresión de 20P1F12/TMPRSS2 puede proporcionar información útil para predecir la susceptibilidad a fases de enfermedad particulares, progresión y/o agresividad del tumor. Por tanto, otro aspecto de la invención proporciona procedimientos y ensayos para determinar el estado de expresión de 20P1F12/TMPRSS2 y diagnosticar cánceres que expresan 20P1F12/TMPRSS2.

En una realización, un ensayo útil en la determinación de la presencia de cáncer en un individuo comprende detectar un aumento significativo en la expresión de ARNm o de proteína 20P1F12/TMPRSS2 en una célula o muestra de tejido de prueba con respecto a niveles de expresión en la célula o tejido normal correspondiente. La presencia de ARNm de 20P1F12/TMPRSS2 en una muestra de colon, por ejemplo, puede indicar la aparición, presencia y/o gravedad del cáncer de colon ya que el colon normal no expresa 20P1F12/TMPRSS2. En una realización relacionada, el estado de expresión de 20P1F12/TMPRSS2 puede determinarse al nivel de proteínas en vez de al nivel de ácidos nucleicos. Por ejemplo, un procedimiento o ensayo tal comprendería determinar el nivel de proteína 20P1F12/TMPRSS2 expresado por células en una muestra de tejido de prueba y comparar el nivel así determinado con el nivel de 20P1F12/TMPRSS2 expresado en una muestra normal correspondiente. La presencia de proteína 20P1F12/TMPRSS2 puede evaluarse, por ejemplo, usando procedimientos inmunohistoquímicos. Los anticuerpos 20P1F12/TMPRSS2 o los constituyentes de unión que pueden detectar la expresión de la proteína 20P1F12/TMPRSS2 pueden usarse en una variedad de formatos de ensayo muy conocidos en la técnica para este fin.

La sangre periférica puede ensayarse convenientemente para la presencia de células de cáncer de próstata o de colon usando RT-PCR para detectar la expresión de 20P1F12/TMPRSS2 en su interior. La presencia de ARNm de 20P1F12/TMPRSS2 amplificable por RT-PCR puede indicar la presencia de uno de estos cánceres. Los ensayos de detección por RT-PCR para células tumorales en sangre periférica están siendo actualmente evaluados para uso en el diagnóstico y el control de varios tumores sólidos humanos. En el campo del cáncer de próstata, éstos incluyen ensayos de RT-PCR para la detección de células que expresan PSA y PSM (Verkaik y col., 1997, Urol. Res. 25: 373-384; Ghossein y col., 1995, J. Clin. Oncol. 13: 1195-2000; Heston y col., 1995, Clin. Chem. 41: 1687-1688). Los ensayos de RT-PCR son muy conocidos en la técnica.

En otra solución puede usarse un ensayo sensible recientemente descrito para detectar y caracterizar células de carcinoma en sangre (Racila y col., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 4589-4594). Este ensayo combina el enriquecimiento inmunomagnético con los análisis de citometría de flujo multiparamétrica e inmunohistoquímicos, y es altamente sensible a la detección de células cancerosas en sangre, según se informa puede detectar una célula epitelial en 1 ml de sangre periférica.

Los procedimientos para detectar y cuantificar la expresión de ARNm o proteína 20P1F12/TMPRSS2 se describen en este documento y usan tecnologías convencionales de detección y cuantificación de ácidos nucleicos y proteínas muy conocidas en la técnica. Los procedimientos convencionales para la detección y la cuantificación de ARNm de 20P1F12/TMPRSS2 incluyen hibridación *in situ* usando ribosondas de 20P1F12/TMPRSS2 marcadas,

transferencia Northern y técnicas relacionadas usando sondas de polinucleótidos 20P1F12/TMPRSS2, análisis por RT-PCR usando cebadores específicos para 20P1F12/TMPRSS2 y otros procedimientos de detección de tipo amplificación tales como, por ejemplo, ADN ramificado, SISBA, TMA y similares. En una realización específica puede usarse RT-PCR semicuantitativa para detectar y cuantificar la expresión de ARNm de 20P1F12/TMPRSS2 como se describe en los siguientes ejemplos. Para este fin puede usarse cualquier número de cebadores que pueda amplificar 20P1F12/TMPRSS2 que incluye, pero no se limita a, los diversos conjuntos de cebadores específicamente descritos en este documento. Para este fin pueden usarse procedimientos convencionales para la detección y la cuantificación de proteína. En una realización específica pueden usarse anticuerpos policlonales o monoclonales específicamente reactivos con la proteína 20P1F12/TMPRSS2 en un ensayo inmunohistoquímico de tejido biopsiado.

Los inventores también describen kits para las aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas descritas o sugeridas anteriormente. Tales kits pueden comprender un medio de vehículo que está compartimentado para recibir en un estrecho confinamiento uno o más medios de recipiente tales como viales, tubos y similares, comprendiendo cada uno de los medios de recipiente uno de los elementos separados que van a usarse en el procedimiento. Por ejemplo, uno de los medios de recipiente puede comprender una sonda que está o puede estar detectablemente marcada. Tal sonda puede ser un anticuerpo o polinucleótido específico para la proteína o gen/ARNm de 20P1F12/TMPRSS2, respectivamente. Si el kit utiliza hibridación de ácidos nucleicos para detectar el ácido nucleico diana, el kit también puede tener recipientes que contienen nucleótido(s) para la amplificación de la secuencia de ácidos nucleicos diana y/o un recipiente que comprende medios indicadores tales como una proteína de unión a biotina tal como avidina o estreptavidina unida a una molécula indicadora tal como una marca enzimática, fluorescente o de radionucleótido.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: AISLAMIENTO DE ADNc CORRESPONDIENTE AL GEN 20P1F12/TMPRSS2 POR ANÁLISIS DE CLONACIÓN Y EXPRESIÓN POR HIBRIDACIÓN SSH

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Líneas celulares y tejidos humanos

Todas las líneas celulares de cáncer humano usadas en este estudio se obtuvieron de la ATCC. Todas las líneas celulares se mantuvieron en DMEM con suero bovino fetal al 10%. Las PREC (células epiteliales de próstata primarias) se obtuvieron de Clonetics y se cultivaron en medio PREBM complementado con factores de crecimiento (Clonetics).

Todos los xenoinjertos de cáncer de próstata humano se proporcionaron originalmente por Charles Sawyers (UCLA) (Klein y col., 1997). Los xenoinjertos de LAPC-4 DA y LAPC-9 DA se sometieron rutinariamente a pases como pequeños trozos de tejido en machos receptores con IDCG. Los xenoinjertos de LAPC-4 IA y LAPC-9 IA se derivaron como se ha descrito previamente (Klein y col., 1997) y se sometieron a pases en ratones con IDCG macho castrados o en hembras.

Los tejidos humanos para los análisis de ARN y de proteína se obtuvieron del Human Tissue Resource Center (HTRC) en UCLA (Los Angeles, CA) y de QualTek, Inc. (Santa Barbara, CA). Una muestra de tejido de hiperplasia benigna de próstata se derivó del paciente.

Aislamiento de ARN:

Se homogeneizaron tejido tumoral y líneas celulares en el reactivo Trizol (Life Technologies, Gibco BRL) usando 10 ml/g de tejido o 10 ml/10⁸ células para aislar ARN total. El ARN de poli A se purificó a partir de ARN total usando los kits Qiagen's Oligotex mRNA Mini y Midi. El ARN total y el ARNm se cuantificaron por análisis espectrofotométrico (D.O. 260/280 nm) y se analizaron por electroforesis en gel.

Oligonucleótidos:

Se usaron los siguientes oligonucleótidos purificados por HPLC.

RSACDN (cebador de síntesis de ADNc):

5'TTTTGTACAAGCTT₃₀3'

Adaptador 1:

5'CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT3'
3'GGCCCGTCCA5'

Adaptador 2:

5'GTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT3'
3'CGGCTCCA5'

Cebador de PCR 1:

5'CTAATACGACTCACTATAGGGC3'

Cebador anidado (CA)1:

5'TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT3'

Cebador anidado (CA)2:

5'AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT3'

Hibridación sustractiva por supresión:

Se usó hibridación sustractiva por supresión (SSH) para identificar ADNc correspondientes a genes que pueden regularse por incremento en cáncer de próstata dependiente de andrógenos en comparación con hiperplasia benigna de próstata.

Los ADNc bicatenarios correspondientes al xenoinjerto de LAPC-4 DA (probador) y el tejido de HBP (conductor) se sintetizaron a partir de 2 µg de ARN de poli(A)* aislado de xenoinjerto y tejido de HBP como se ha descrito anteriormente usando el kit CLONTECH's PCR-Select cDNA Subtraction y 1 ng del oligonucleótido RSACDN como cebador. La síntesis de la primera y la segunda cadena se llevó a cabo como se describe en el protocolo del manual de usuario del kit (protocolo de CLONTECH nº PT1117-1, nº de catálogo K1804-1). El ADNc resultante se digirió con Rsa I durante 3 h a 37°C. El ADNc digerido se extrajo con fenol/cloroformo (1:1) y se precipitó en etanol.

El ADNc del conductor (HBP) se generó combinando en una relación 4 a 1 ADNc de HBP digerido con Rsa I con ADNc digerido de hígado de ratón con el fin garantizar que los genes murinos se restaran del ADNc del probador (LAPC-4 DA).

El ADNc (LAPC-4 AD) del probador se generó diluyendo 1 µl de ADNc de LAPC-4 DA digerido con Rsa I (400 ng) en 5 µl de agua. El ADNc diluido (2 µl, 160 ng) se ligó entonces a 2 µl de adaptador 1 y adaptador 2 (10 µM), en reacciones de ligación separadas, en un volumen total de 10 µl a 16°C durante la noche usando 400 u de ADN ligasa T4 (CLONTECH). La ligación se terminó con 1 µl de EDTA 0,2 M y calentando a 72°C durante 5 min.

La primera hibridación se realizó añadiendo 1,5 µl (600 ng) de ADNc del conductor a cada uno de los dos tubos que contenían 1,5 µl (20 ng) de ADNc del probador ligado al adaptador 1 y al adaptador 2. En un volumen final de 4 µl, las muestras se recubrieron de aceite mineral, se desnaturalizaron en un ciclador térmico de MJ Research a 98°C durante 1,5 minutos y luego se dejaron hibridar durante 8 h a 68°C. Entonces, las dos hibridaciones se mezclaron juntas con 1 µl adicional de ADNc del conductor recientemente desnaturalizado y se dejaron hibridar durante la noche a 68°C. Entonces, la segunda hibridación se diluyó en 200 µl de HEPES 20 mM, pH 8,3, NaCl 50 mM, EDTA 0,2 mM, se calentó a 70°C durante 7 min y se guardó a -20°C.

Amplificación por PCR, clonación y secuenciación de fragmentos génicos generados a partir de SSH:

Para amplificar fragmentos génicos resultantes de reacciones de SSH se realizaron dos amplificaciones por PCR. En la reacción de PCR primaria, 1 µl de la mezcla de hibridación final diluida se añadió a 1 µl del cebador de PCR 1 (10 µM), 0,5 µl de mezcla dNTP (10 µM), 2,5 µl de 10 x tampón de reacción (CLONTECH) y 0,5 µl de 50 x mezcla de polimerasa de ADNc Advantage (CLONTECH) en un volumen final de 25 µl. La PCR 1 se realizó usando las siguientes condiciones: 75°C durante 5 min, 94°C durante 25 s, luego 27 ciclos de 94°C durante 10 s, 66°C durante 30 s, 72°C durante 1,5 min. Se realizaron cinco reacciones de PCR primarias separadas para cada experimento. Los productos se reunieron y se diluyeron 1:10 con agua. Para la reacción de PCR secundaria, 1 µl de

la reacción de PCR primaria reunida y diluida se añadió a la misma mezcla de reacción que se usa para PCR 1, excepto que se usaron los cebadores CA1 y CA2 (10 µM) en lugar del cebador de PCR 1. La PCR 2 se realizó usando 10-12 ciclos de 94°C durante 10 s, 68°C durante 30 s, 72°C durante 1,5 minutos. Los productos de PCR se analizaron usando electroforesis en gel de agarosa al 2%.

5 Los productos de PCR se insertaron en pCR2.1 usando el kit de clonación de vectores T/A (Invitrogen). La *E. coli* transformada se sometió a selección azul/blanca y con ampicilina. Se escogieron las colonias blancas y se seleccionaron en placas de 96 pocillos y se cultivaron en cultivo líquido durante la noche. Para identificar insertos se realizó amplificación por PCR en 1 ml de cultivo bacteriano usando las condiciones de PCR1 y CA1 y CA2 como cebadores. Los productos de PCR se analizaron usando electroforesis en gel de agarosa al 2%.

10 Los clones bacterianos se almacenaron en glicerol al 20% en un formato de 96 pocillos. El ADN de plásmido se preparó, se secuenció y se sometió a búsquedas de homología de ácidos nucleicos de las bases de datos GenBank, dBest y NCI-CGAP.

Análisis de expresión por RT-PCR:

15 Los ADNc de la primera cadena se generaron a partir de 1 µg de ARNm con cebadores de oligo (dT)12-18 usando el sistema Gibco-BRL Superscript Preamplification. Se usó el protocolo del fabricante y se incluyó una incubación durante 50 min a 42°C con transcriptasa inversa seguido de tratamiento con RNasa H a 37°C durante 20 min. Después de completarse la reacción, el volumen se aumentó hasta 200 µl con agua antes de la normalización. Los ADNc de la primera cadena a partir de 16 tejidos humanos normales diferentes se obtuvieron de Clontech.

20 La normalización de los ADNc de la primera cadena a partir de múltiples tejidos se realizó usando los cebadores 5'atatcgccgctcgtcgtcgacaa3' y 5'agccacacgcagctcattgtagaagg3' para amplificar β-actina. El ADNc de la primera cadena (5 µl) se amplificó en un volumen total de 50 µl que contenía cebadores 0,4 µM, 0,2 µM de cada dNTP, 1 x tampón de PCR (Clontech, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, pH 8,3) y 1 x ADN polimerasa Klentaq (Clontech). Se extrajeron cinco µl de la reacción de PCR a 18, 20 y 22 ciclos y se usaron para electroforesis en gel de agarosa. La PCR se realizó usando un ciclador térmico de MJ Research bajo las siguientes condiciones:

25 la desnaturalización inicial fue a 94°C durante 15 s, seguido de 18, 20 y 22 ciclos de 94°C durante 15 s, 65°C durante 2 min, 72°C durante 5 s. Se llevó a cabo una extensión final a 72°C durante 2 min. Después de la electroforesis en gel de agarosa se compararon las intensidades de las bandas de β-actina de 283 pb de los múltiples tejidos mediante inspección visual. Se calcularon los factores de dilución para los ADNc de la primera cadena para producir intensidades de bandas de β-actina iguales en todos los tejidos después de 22 ciclos de PCR. Se requirieron tres rondas de normalización para lograr intensidades de bandas iguales en todos los tejidos después de 22 ciclos de PCR.

30 Para determinar los niveles de expresión del gen 20P1F12 se analizaron 5 µl de ADNc de la primera cadena normalizado por PCR usando 25, 30 y 35 ciclos de amplificación usando los siguientes pares de cebadores que se diseñaron con la ayuda de MIT; (para detalles, véase www.genome.wi.mit.edu):

35

5' AGT CTT CCT GCT GAG TCC TTT CC 3'
5' CAA GGG CAC TGT CTA TAT TCT CAC C 3'

El análisis de expresión semicuantitativa se logró comparando los productos de PCR a números de ciclos que dieron ligeras intensidades de bandas.

RESULTADOS:

40 Se realizaron varios experimentos de SSH como se describe en Materiales y procedimientos, anteriormente, y condujeron al aislamiento de numerosos clones de fragmentos de genes candidatos. Todos los clones candidatos se secuenciaron y se sometieron a análisis de homología contra todas las secuencias en las principales bases de datos de genes públicas y de EST con el fin de proporcionar información sobre la identidad del gen correspondiente y ayudar a guiar la decisión de analizar un gen particular para la expresión diferencial.

45 Uno de los clones de ADNc, designado 20P1F12, mostró identidad con una serina-proteasa TMPRSS2 recientemente descrita (Paoloni-Giacobino y col., 1997, Genomics 44: 309-320). El fragmento de ADNc de 20P1F12 aislado tiene 388 pb de longitud y tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la FIG. 4. El análisis de expresión diferencial por RT-PCR mostró que el gen 20P1F12 se expresa a niveles aproximadamente iguales en próstata normal y en los xenoinjertos de LAPC-4 y LAPC-9 (FIG. 5, panel A). Otro análisis de expresión por RT-PCR de los

50 ADNc de la primera cadena a partir de 16 tejidos normales mostró los mayores niveles de expresión de 20P1F12 en próstata. Se observó expresión de nivel sustancialmente menor en varios otros tejidos normales (es decir, colon, páncreas, riñón, hígado y pulmón) (FIG. 5, Paneles B y C).

EJEMPLO 2: ANÁLISIS DE TRANSFERENCIA NORTHERN DE EXPRESIÓN DEL GEN DE 20P1F12/TMPRSS2

Se realizó el análisis de transferencia Northern en un panel de 16 tejidos humanos normales usando una sonda de 20P1F12/TMPRSS2 marcada (correspondiente al ADNc por SSH de 20P1F12 de la FIG. 4) para confirmar la especificidad de la próstata de la expresión de 20P1F12/TMPRSS2 inicialmente establecida por análisis de expresión por RT-PCR. Los resultados mostrados en la FIG. 6 (Paneles A y B) confirman y extienden los análisis por RT-PCR y muestran que la expresión de 20P1F12/TMPRSS2 es relativamente específica de la próstata, ya que la expresión en próstata es claramente muchas veces más mayor que la expresión en pulmón, riñón, páncreas o colon, en los que sólo se detecta expresión de muy bajo nivel. Se observó expresión no detectable en cualquiera de los otros 11 tejidos normales usados en este panel.

Además, también se examinaron los niveles de expresión de 20P1F12/TMPRSS2 en los xenoinjertos de LAPC-4 y LAPC-9 por análisis de transferencia Northern. Los resultados, mostrados en la FIG. 6 (Panel C) indican niveles de expresión similares en los xenoinjertos y en tejido normal, con expresión de menor nivel observada sólo en el xenoinjerto de LAPC-9. Otros análisis de transferencia Northern de la expresión de 20P1F12/TMPRSS2 en un gran panel de células cancerosas se describe en el Ejemplo 4, más adelante.

EJEMPLO 3: CLONACIÓN DE ADNc DE 20P1F12 DE LONGITUD COMPLETA

Un ADNc de longitud completa que codifica el gen 20P1F12/TMPRSS2 se aisló de una biblioteca de próstata humana y se designó 20P1F12-GTC1. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de 20P1F12-GTC1 se muestran en la FIG. 1. El plásmido p20P1F12-GTC1 (que lleva el ADNc de 20P1F12-GTC1) se depositó en la ATCC (Manassas, Virginia) el 12 de febrero de 1999 y se le ha concedido el nº de designación de la ATCC 207097. El ADNc de 20P1F12-GTC1 de aproximadamente 3,5 kb codifica una proteína de 492 aminoácidos que es casi, pero no completamente, idéntica a la secuencia previamente descrita (FIG. 2). Hay varias diferencias en la secuencia de nucleótidos del ADNc de 20P1F12-GTC1 con respecto a la secuencia de TMPRSS2 publicada, cinco de las cuales producen diferentes aminoácidos codificados, como se muestra en el alineamiento de aminoácidos de la FIG. 3. Específicamente, cuatro de las diferencias de aminoácidos están en el dominio de proteasa, tres de las cuales son diferencias de aminoácidos no conservativas que podrían afectar a la función y/o especificidad de la proteasa. No está claro cómo estas diferencias de secuencias de aminoácidos podrían afectar a la actividad biológica. Sin embargo, es posible que 20P1F12/TMPRSS2 y TMPRSS2 se expresen de forma diferente en vista de los datos de los solicitantes que muestran un patrón de expresión de ARNm divergente en tejidos humanos normales.

EJEMPLO 4: EXPRESIÓN DE 20P1F12/TMPRSS2 EN CÁNCER DE PRÓSTATA Y DE COLON

Para analizar la expresión de 20P1F12/TMPRSS2 en tejidos y líneas celulares de cáncer se realizó transferencia Northern en ARN derivado de los xenoinjertos de LAPC y un panel de líneas celulares de cáncer de próstata y no próstata. Los resultados muestran altos niveles de expresión de 20P1F12/TMPRSS2 en todos los xenoinjertos de LAPC y en líneas celulares de cáncer de colon (FIG. 7). Se detectaron niveles de expresión similares en próstata, LAPC-4 DA, LAPC-4 IA, LAPC-9 DA y LNCaP. Se observaron niveles más bajos de 20P1F12/TMPRSS2 en células LAPC-9 IA y PC-3 sin expresión observada en DU145. También se detectaron altos niveles de expresión de 20P1F12/TMPRSS2 en tres de cuatro líneas celulares de cáncer de colon que incluían LoVo, T84 y Colo-205.

EJEMPLO 5: CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA 20P1F12/TMPRSS2**Generación de anticuerpos monoclonales 20P1F12/TMPRSS2**

TMPRSS2 representa una posible diana terapéutica para cánceres de próstata y de colon. Como antígeno de la superficie celular puede ser una diana particularmente buena para terapia con anticuerpos. Para explorar esta posibilidad y para caracterizar adicionalmente la proteína 20P1F12/TMPRSS2 se generaron anticuerpos monoclonales dirigidos contra una proteína de fusión GST-20P1F12/TMPRSS2. El inmunógeno comprendía una región de aproximadamente 8 kD dentro del dominio de proteasa, específicamente los residuos de aminoácidos 362 a 440 (véase la FIG. 1). Los ratones se inmunizaron con GST-TMPRSS2 purificada y se generaron hibridomas. Los sobrenadantes de hibridomas se cribaron para anticuerpos específicos por transferencia Western usando lisados de células 293T transfectadas con 20P1F12/TMPRSS2. Se identificaron un total de 6 hibridomas que reconocen específicamente 20P1F12/TMPRSS2 por transferencia Western (FIG. 8a).

La transferencia Western de lisados de células LNCaP, LAPC-4 y LAPC-9 identifica dos bandas de proteínas principales de aproximadamente 70 y 32 kilodalton (kD) (FIG. 8b). El peso molecular (MW) predicho de 20P1F12/TMPRSS2 es 54 kD, sugiriendo que la isoforma de 70 kD está modificada, posiblemente por glicosilación. La forma de 32 kD puede ser un fragmento proteolíticamente escindido que contiene los epítopes del extremo carboxilo reconocidos por los anticuerpos.

Pueden generarse mAb 20P1F12/TMPRSS2 adicionales por inmunización basada en células usando

células LAPC-9 y células PC-3 que expresan 20P1F12/TMPRSS2 como agente de cribado para ELISA basados en células. Además, los mAb 20P1F12/TMPRSS2 pueden generarse usando la proteína 20P1F12/TMPRSS2 purificada como inmunógeno. Por ejemplo, 20P1F12/TMPRSS2 recombinante que tiene un marca de His en el extremo amino puede expresarse en un sistema de baculovirus usando pBlueBac4.5 (Invitrogen). 20P1F12/TMPRSS2 marcada con His puede entonces purificarse usando una columna de níquel, cuantificarse y usarse como inmunógeno. El cribado de anticuerpos monoclonales puede realizarse usando ELISA basados en células con, por ejemplo, células LNCaP y PC-3/TMPRSS2.

Localización de la superficie celular

Para estudiar las características de la proteína 20P1F12/TMPRSS2 se clonó ADNc de 20P1F12 (FIG. 1) en pcDNA 3.1/myc-His (Invitrogen), que proporciona una marca de 6-His en el extremo carboxilo. El constructo se transfeció en células 293T y se analizó por biotinilación de la superficie celular. Las proteínas de la superficie celular biotiniladas se purificaron por afinidad usando estreptavidina-Sepharose. El análisis de transferencia Western de proteínas purificadas por afinidad con estreptavidina usando un anticuerpo dirigido contra His demostró la presencia de la proteína 20P1F12/TMPRSS2 (FIG. 9a). Por tanto, como se predice a partir del análisis de secuencias, 20P1F12/TMPRSS2 se expresa en la superficie celular de células transfectadas.

Para examinar la expresión de la superficie celular de 20P1F12/TMPRSS2 endógena en células de cáncer de próstata LNCaP y PC-3, las proteínas de la superficie celular biotiniladas se purificaron por afinidad con estreptavidina-Sepharose y se sondaron con anticuerpos dirigidos contra 20P1F12/TMPRSS2. Las transferencias Western de proteínas purificadas con estreptavidina muestran claramente la biotinilación de la superficie celular de 20P1F12/TMPRSS2 endógena en tanto células LNCaP como PC-3 que aparecen como bandas de proteínas de 32 y 70 kD (FIG. 9b). En controles adicionales, la proteína 20P1F12/TMPRSS2 no se detectó en precipitados de estreptavidina a partir de células no biotiniladas (Fig. 8b). Estos datos combinados con análisis de secuencias predicen que 20P1F12/TMPRSS2 es una proteína transmembrana de tipo II.

Interesantemente, las células 293T transfectadas con 20P1F12/TMPRSS2 marcada con His en el extremo carboxilo expresan principalmente la proteína de 70 kD (FIG. 9a). Como el dominio de proteasa de 20P1F12/TMPRSS2 se localiza en el extremo carboxilo, es posible que el fragmento de 32 kD sea un resultado de la escisión autocatalítica, que es inhibida por la marca His. Parece que la molécula relacionada, hepsina (TMPRSS1), puede autoactivarse en un modo dependiente de la concentración (Vu y col., 1997, J. Biol. Chem. 272: 31315-31320). Esta escisión autocatalítica puede explotarse para identificar moléculas pequeñas que inhiben la actividad de 20P1F12/TMPRSS2. Las células pueden crecer en presencia o ausencia de inhibidores de moléculas pequeñas para buscar específicamente la inhibición de la escisión. Tales moléculas pequeñas pueden probarse como agentes terapéuticos contra el cáncer de próstata.

Glicosilación de 20P1F12/TMPRSS2

El MW predicho de 20P1F12/TMPRSS2 es significativamente más pequeño que el MW aparente detectado por transferencia Western. Esto sugiere que 20P1F12/TMPRSS2 puede estar glicosilada. La secuencia GTC1 indica que hay tres posibles sitios de glicosilación con la secuencia consenso de NX(S/T) (residuos 128, 213, 249). Para explorar la posibilidad de que 20P1F12/TMPRSS2 esté glicosilada, 20P1F12/TMPRSS2 marcada con His se transfeció en células 293T y se purificó usando níquel-agarosa (Invitrogen). La proteína purificada por afinidad se eluyó con EDTA 50 mM, pH 8,0, y se desglicosiló usando N-glicosidasa F (Boehringer Mannheim) según el protocolo del fabricante. La proteína sin tratar y desglicosilada se analizaron por transferencia Western usando anticuerpos dirigidos contra His. Los resultados muestran un desplazamiento del MW de 5-8 kD de 20P1F12/TMPRSS2 con tratamiento con N-glicosidasa F (FIG 10), que indica que 20P1F12/TMPRSS2 es de hecho una proteína glicosilada. La 20P1F12/TMPRSS2 desglicosilada todavía presentó un MW de al menos 5-10 kD más grande que el tamaño previsto, que indica que o la reacción de desglicosilación no se completó (o que la glicosilación está ligada a O), o que 20P1F12/TMPRSS2 puede presentar modificaciones postraduccionales adicionales (tales como fosforilación, sulfación).

Regulación por andrógenos

La transferencia Northern muestra que la expresión de 20P1F12/TMPRSS2 parece disminuir en el xenoinjerto de LAPC-9 independiente de andrógenos y las líneas celulares PC-3 y DU145 independientes de andrógenos (FIG. 6), sugiriendo que 20P1F12/TMPRSS2 puede ser un gen regulado por andrógeno. Para explorar esta posibilidad, células LNCaP, que son dependientes de andrógenos y expresan niveles significativos de 20P1F12/TMPRSS2, se privaron de andrógenos durante una semana haciéndolas crecer en medios que contenían suero bovino fetal (SBF) tratado con carbón vegetal al 2%. Entonces, las células se estimularon con mibolerona, un análogo de andrógeno sintético, en diversos momentos de tiempo. Las células se recogieron para ARN y transferencia Northern. Como control de carga, la misma transferencia también se sondó con β -actina. Los resultados (FIG. 11) muestran una clara reducción de la expresión de 20P1F12/TMPRSS2 durante la privación de andrógenos (FIG. 11). La adición de mibolerona aumentó significativamente la expresión de 20P1F12/TMPRSS2,

que indica que es un gen sensible a andrógenos. La expresión de antígeno específico de la próstata (PSA) en las mismas muestras se monitorizó como control positivo para la regulación por andrógenos (FIG. 11).

Para determinar el tiempo óptimo de inducción de 20P1F12/TMPRSS2, células privadas de andrógenos se estimularon con mibolerona durante diversos momentos de tiempo. Las células se recogieron para el aislamiento de ARN y de proteína para realizar transferencia Northern y Western, respectivamente. Los resultados (FIG. 12) muestran inducción del mensajero de 20P1F12/TMPRSS2 en el plazo de tres horas desde la estimulación y aumentó durante 24 horas después de la adición de hormona.

Para analizar los niveles de proteína se realizó transferencia Western de lisados celulares usando el mAb 1F9. Controles adicionales para la expresión de 20P1F12/TMPRSS2 incluyeron células PC-3 infectadas con un retrovirus que codifica tanto neo como 20P1F12/TMPRSS2. Las células PC-3 infectadas se seleccionaron en G418 durante 2-3 semanas y se recogieron para la transferencia Western. Los resultados mostraron una fuerte expresión de 20P1F12/TMPRSS2 en las células infectadas con un virus de 20P1F12/TMPRSS2 y expresión no detectable de 20P1F12/TMPRSS2 en las células neo.

Cuando se miran las células LNCaP privadas de andrógenos, la expresión de 20P1F12/TMPRSS2 todavía es detectable, pero es visiblemente reducida cuando se comparó con células estimuladas por andrógenos. Sin embargo, el primer momento de tiempo de expresión inducida aparece 9 horas después de la estimulación, que indica que la expresión de la proteína 20P1F12/TMPRSS2 se queda atrás en la inducción de ARN (FIG. 12).

Estos resultados demuestran que 20P1F12/TMPRSS2 es un gen regulado por andrógeno, similar a otras proteasas específicas de la próstata tales como PSA y hK2 (Young y col., 1995, J. Androl. 16:97).

Efecto de 20P1F12/TMPRSS2 en la morfología de NIH 3T3

20P1F12/TMPRSS2 presenta expresión específica de la próstata y parece que se regula por andrógeno. Para determinar el efecto de la expresión de 20P1F12/TMPRSS2 en una línea celular heteróloga de cáncer de no próstata se usó el retrovirus de 20P1F12/TMPRSS2 para infectar células NIH 3T3. La morfología de las células infectadas con el retrovirus de 20P1F12/TMPRSS2 se comparó con la morfología de las células infectadas con el virus de control (neo). Una población de células infectadas presentó un aspecto vacuolar distinto en comparación con células de control (FIG. 13), que parece que establecen una correlación con altos niveles de expresión. Tras efectuar pases de esta población de células infectadas, las células que llevan vacuolas desaparecieron gradualmente con expresión aparentemente reducida de 20P1F12/TMPRSS2.

Evaluación de la función de 20P1F12/TMPRSS2

La función de 20P1F12/TMPRSS2 puede evaluarse en células de mamífero manipuladas para expresar 20P1F12/TMPRSS2. Para este fin, 20P1F12/TMPRSS2 se clona convenientemente en varios vectores que incluyen una marca de pcDNA 3.1/myc-His (Invitrogen), el vector retroviral pSRatKneo (Muller y col., 1991, MCB 11:1785) y pIND (Invitrogen), un sistema de expresión inducible por ecdisona. Usando estos vectores de expresión, 20P1F12/TMPRSS2 se expresa en varias líneas celulares que incluyen PC-3, NIH 3T3, fibroblastos de células L de ratón y 293T. La expresión de 20P1F12/TMPRSS2 se monitoriza usando anticuerpos dirigidos contra 20P1F12/TMPRSS2 por análisis de Western y FACS. TMPRSS2 purificado puede usarse para identificar el sustrato.

Entonces, tales líneas celulares de mamífero que expresan 20P1F12/TMPRSS2 se prueban en varios ensayos *in vitro* que incluyen proliferación celular, adhesión de células, invasión de células usando un sistema de cultivo por invasión de membrana (MICS) (Welch y col., Int. J. Cancer 43: 449-457) en cultivo de tejido y ensayos *in vivo* que incluyen formación de tumores en ratones con IDCG. El fenotipo de células de 20P1F12/TMPRSS2 se compara con el fenotipo de células que no expresan 20P1F12/TMPRSS2.

Para evaluar la función funcional de los diferentes dominios en 20P1F12/TMPRSS2 se generan los siguientes mutantes de delección y mutantes puntuales: (i) ΔSRCR (delección de 93 a.a.); (ii) ΔLDLRA (delección de 35 a.a.); y (iii) mutante de la triada catalítica: H296Q, D345N, S441A (mutantes de un único punto). Los mutantes de 20P1F12/TMPRSS2 se clonan en los vectores retrovirales pSRatKneo para la expresión en células de mamífero. Los mutantes resultante son útiles para elucidar la importancia de los diferentes dominios y residuos. Además, estos experimentos son útiles para determinar si tales mutantes funcionan como moléculas negativas dominantes. La actividad negativa dominante puede manifestarse en células que expresan 20P1F12/TMPRSS2 endógena tales como LNCaP. La actividad negativa dominante puede ser debida a interacciones con sustratos mediante dominio de proteasa, o mediante los dominios de interacción proteína-proteína. Las moléculas de 20P1F12/TMPRSS2 mutantes se prueban en los mismos ensayos *in vitro* e *in vivo* que 20P1F12/TMPRSS2 natural (véase anteriormente). Tales moléculas de 20P1F12/TMPRSS2 negativas dominantes pueden ser terapéuticamente útiles. Por ejemplo, una 20P1F12/TMPRSS2 negativa dominante puede introducirse en células de cáncer de próstata mediante vectores de terapia génica que pueden administrar y expresar la secuencia codificante correspondiente a células de tumor de próstata. Similarmente, tales procedimientos pueden ser útiles en el tratamiento de cáncer de colon.

5 La determinación de las características de expresión de 20P1F12/TMPRSS2 en tejidos de ratón normales y en ratones transgénicos proporciona adicionalmente información sobre la función de 20P1F12/TMPRSS2. El análisis de transferencia Northern usando sondas diseñadas a partir de las secuencias de 20P1F12/TMPRSS2 proporcionadas en este documento puede usarse para definir el patrón de expresión de 20P1F12/TMPRSS2 murina. Además, puede analizarse la expresión de 20P1F12/TMPRSS2 durante el desarrollo en el embrión de ratón. Los datos resultantes identificarán una fuente de tejido para clonar el gen de ratón y predecirán qué tejidos serían afectados en un estudio de inactivación de ratón transgénico.

10 El ratón transgénico puede generarse y usarse para definir la función biológica de 20P1F12/TMPRSS2 en un entorno *in vivo*. En una solución se usan los genes 20P1F12/TMPRSS2 humanos o de ratón para generar ratones transgénicos. La expresión en exceso de la formación espontánea de tumores en ratones puede estudiarse usando ratones transgénicos. En otra solución, las inactivaciones de genes 20P1F12/TMPRSS2 se generan en ratones. Tales ratones también pueden cruzarse con otros modelos de ratón de cáncer de próstata tales como el modelo TRAMP (Greenberg y col., 1995, PNAS 92:3439) para estudiar la influencia sobre la agresividad y la metástasis del cáncer de próstata y para observar cambios en la progresión de la enfermedad.

15 Los experimentos que prueban la interacción funcional de 20P1F12/TMPRSS2 con inhibidores de la serina-proteasa también proporcionarán información sobre la función de 20P1F12/TMPRSS2. Para este fin, la inhibición se lleva a cabo usando inhibidores de moléculas pequeñas o inhibidores biológicos.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína 20P1F12/TMPRSS2 aislada que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la FIG. 1.
- 5 2. Un polinucleótido aislado seleccionado de (a) un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos que se muestra en la FIG. 1, en la que T también puede ser U; (b) un polinucleótido que codifica un polipéptido 20P1F12/TMPRSS2 cuya secuencia está codificada en el ADNc contenido en el plásmido p20P1F12-GTC1 depositado en la Colección americana de cultivos tipo con nº de acceso 207097; y (c) un polinucleótido que codifica la proteína 20P1F12/TMPRSS2 de la FIG. 1.
3. Un vector de expresión recombinante que contiene un polinucleótido según la reivindicación 2.
- 10 4. El vector de expresión de la reivindicación 3, en el que el vector es el plásmido p20P1F12-GTC1 como se ha depositado en la Colección americana de cultivos tipo con nº de acceso 207097.
5. El vector de expresión de la reivindicación 3, en el que el vector es un vector vírico.
6. El vector de expresión de la reivindicación 5, en el que el vector vírico se selecciona de variolovacuna, viruela aviar, virus de la viruela del canario, adenovirus, virus de la gripe, virus de la poliomielitis, virus adenoasociado, lentivirus y virus de Sindbis.
- 15 7. Una célula huésped que contiene un vector de expresión según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6.
8. Un ensayo para determinar la presencia de cáncer de próstata o de colon en un individuo que comprende poner en contacto una muestra de prueba de tejido de próstata o de colon con un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a la proteína que está constituida por la secuencia de aminoácidos de la FIG. 1, y cuyo anticuerpo está marcado con un marcador detectable, y detectar la unión de la proteína 20P1F12/TMPRSS2 en la muestra al mismo, en el que un aumento significativo en la expresión de la proteína 20P1F12/TMPRSS2 en la muestra de tejido de prueba con respecto a niveles de expresión en el tejido normal correspondiente indica la presencia de cáncer de próstata o de colon.
- 20 9. Un ensayo para determinar la presencia de cáncer de próstata o de colon en un individuo que comprende:
 - 25 (a) poner en contacto una muestra de tejido de próstata o de colon con una sonda de polinucleótidos que se hibrida específicamente con el polinucleótido de la FIG. 1; y
 - (b) detectar la presencia de un complejo de hibridación formado por la hibridación de la sonda con el polinucleótido 20P1F12/TMPRSS2 en la muestra, en el que la presencia del complejo de hibridación indica la presencia del polinucleótido 20P1F12/TMPRSS2 dentro de la muestra, en el que un aumento significativo en el polinucleótido 20P1F12/TMPRSS2 en la muestra con respecto a niveles en un tejido normal correspondiente indica la presencia de cáncer.
- 30 10. Un ensayo para determinar la presencia de cáncer de próstata o de colon en un individuo que comprende:
 - (a) producir ADNc a partir de una muestra de tejido de próstata o de colon mediante transcripción inversa usando al menos un cebador;
 - 35 (b) amplificar el ADNc así producido usando cebadores de sentido directo y de sentido contrario para amplificar el ADNc de 20P1F12/TMPRSS2 en su interior; y
 - (c) detectar la presencia del ADNc de 20P1F12/TMPRSS2 amplificado,
 - 40 en el que los cebadores de sentido directo y de sentido contrario pueden amplificar el polinucleótido de la FIG. 1, y en el que un aumento significativo en el ARNm o ADNc de 20P1F12/TMPRSS2 en la muestra de tejido de prueba con respecto a niveles en un tejido normal correspondiente indica la presencia de cáncer de próstata o de colon.
11. Un ensayo según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que el cáncer es cáncer de próstata.
12. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une inmunoespecíficamente a la proteína que está constituida por la secuencia de aminoácidos de la FIG. 1 para uso en un procedimiento para el tratamiento de cáncer de próstata.
- 45 13. Un anticuerpo o fragmentos de unión a antígeno de la reivindicación 12 conjugado a una toxina o agente terapéutico para uso en un procedimiento para el tratamiento de cáncer de próstata.
14. Uso de un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une inmunoespecíficamente a la

proteína que está constituida por la secuencia de aminoácidos de la FIG. 1 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer de próstata.

15. Uso según la reivindicación 14, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo está conjugado con una toxina o agente terapéutico.

FIG 1

```

5' 11      20      29      38      47      56
   GGC GGA GGC GGA GGC GGA GGG CGA GGG GCG GGG AGC GCC GCC TGG AGC GCG GCA
   ---

   65      74      83      92      101      110
   GGT CAT ATT GAA CAT TCC AGA TAC CTA TCA TTA CTC GAT GCT GTT GAT AAC AGC
   ---

   119     128     137     146     155     164
   AAG ATG GCT TTG AAC TCA GGG TCA CCA CCA GCT ATT GGA CCT TAC TAT GAA AAC
   ---
       M   A   L   N   S   G   S   P   P   A   I   G   P   Y   Y   E   N
   ---

   173     182     191     200     209     218
   CAT GGA TAC CAA CCG GAA AAC CCC TAT CCC GCA CAG CCC ACT GTG GTC CCC ACT
   ---
   H   G   Y   Q   P   E   N   P   Y   P   A   Q   P   T   V   V   P   T
   ---

   227     236     245     254     263     272
   GTC TAC GAG GTG CAT CCG GCT CAG TAC TAC CCG TCC CCC GTG CCC CAG TAC GCC
   ---
   V   Y   E   V   H   P   A   Q   Y   Y   P   S   P   V   P   Q   Y   A
   ---

   281     290     299     308     317     326
   CCG AGG GTC CTG ACG CAG GCT TCC AAC CCC GTC GTC TGC ACG CAG CCC AAA TCC
   ---
   P   R   V   L   T   Q   A   S   N   P   V   V   C   T   Q   P   K   S
   ---

   335     344     353     362     371     380
   CCA TCC GGG ACA GTG TGC ACC TCA AAG ACT AAG AAA GCA CTG TGC ATC ACC TTG
   ---
   P   S   G   T   V   C   T   S   K   T   K   K   A   L   C   I   T   L
   ---

   389     398     407     416     425     434
   ACC CTG GGG ACC TTC CTC GTG GGA GCT GCG CTG GCC GCT GGC CTA CTC TGG AAG
   ---
   T   L   G   T   F   L   V   G   A   A   L   A   A   G   L   L   W   K
   ---

   443     452     461     470     479     488
   TTC ATG GGC AGC AAG TGC TCC AAC TCT GGG ATA GAG TGC GAC TCC TCA GGT ACC
   ---
   F   M   G   S   K   C   S   N   S   G   I   E   C   D   S   S   G   T
   ---

   497     506     515     524     533     542
   TGC ATC AAC CCC TCT AAC TGG TGT GAT GGC GTG TCA CAC TGC CCC GGC GGG GAG
   ---
   C   I   N   P   S   N   W   C   D   G   V   S   H   C   P   G   G   E
   ---

   551     560     569     578     587     596
   GAC GAG AAT CGG TGT GTT CGC CTC TAC GGA CCA AAC TTC ATC CTT CAG GTG TAC
   ---
   D   E   N   R   C   V   R   L   Y   G   P   N   F   I   L   Q   V   Y
   ---

   605     614     623     632     641     650
   TCA TCT CAG AGG AAG TCC TGG CAC CCT GTG TGC CAA GAC GAC TGG AAC GAG AAC
   ---
   S   S   Q   R   K   S   W   H   P   V   C   Q   D   D   W   N   E   N
   ---

   659     668     677     686     695     704
   TAC GGG CCG GCG GCC TGC AGG GAC ATG GGC TAT AAG AAT AAT TTT TAC TCT AGC
   ---
   Y   G   R   A   A   C   R   D   M   G   Y   K   N   N   F   Y   S   S

```

CAA	GGA	ATA	GTG	GAT	GAC	AGC	GGA	TCC	ACC	AGC	TTT	ATG	AAA	CTG	AAC	ACA	AGT
Q	G	I	V	D	D	S	G	S	T	S	F	M	K	L	N	T	S

GCC	GGC	AAT	GTC	GAT	ATC	TAT	AAA	AAA	CTG	TAC	CAC	AGT	GAT	GCC	TGT	TCT	TCA
A	G	N	V	D	I	Y	K	K	L	Y	H	S	D	A	C	S	S

AAA	GCA	GTG	GTT	TCT	TTA	CGC	TGT	ATA	GCC	TGC	GGG	GTC	AAC	TTG	AAC	TCA	AGC
K	A	V	V	S	L	R	C	I	A	C	G	V	N	L	N	S	S

CGC	CAG	AGC	AGG	ATT	GTG	GGC	GGC	GAG	AGC	GCG	CTC	CCG	GGG	GCC	TGG	CCC	TGG
R	Q	S	R	I	V	G	G	E	S	A	L	P	G	A	W	P	W

CAG	GTC	AGC	CTG	CAC	GTC	CAG	AAC	GTC	CAC	GTG	TGC	GGA	GGC	TCC	ATC	ATC	ACC
Q	V	S	L	H	V	Q	N	V	H	V	C	G	G	S	I	I	T

CCC	GAG	TGG	ATC	GTG	ACA	GCC	GCC	CAC	TGC	GTG	GAA	AAA	CCT	CTT	AAC	AAT	CCA
P	E	W	I	V	T	A	A	H	C	V	E	K	P	L	N	N	P

TGG	CAT	TGG	ACG	GCA	TTT	GCG	GGG	ATT	TTG	AGA	CAA	TCT	TTC	ATG	TTC	TAT	GGA
W	H	W	T	A	F	A	G	I	L	R	Q	S	F	M	F	Y	G

GCC	GGA	TAC	CAA	GTA	GAA	AAA	GTG	ATT	TCT	CAT	CCA	AAT	TAT	GAC	TCC	AAG	ACC
A	G	Y	Q	V	E	K	V	I	S	H	P	N	Y	D	S	K	T

AAG	AAC	AAT	GAC	ATT	GCG	CTG	ATG	AAG	CTG	CAG	AAG	CCT	CTG	ACT	TTC	AAC	GAC
K	N	N	D	I	A	L	M	K	L	Q	K	P	L	T	F	N	D

CTA	GTG	AAA	CCA	GTG	TGT	CTG	CCC	AAC	CCA	GGC	ATG	ATG	CTG	CAG	CCA	GAA	CAG
L	V	K	P	V	C	L	P	N	P	G	M	M	L	Q	P	E	Q

CTC	TGC	TGG	ATT	TCC	GGG	TGG	GGG	GCC	ACC	GAG	GAG	AAA	GGG	AAG	ACC	TCA	GAA
L	C	W	I	S	G	W	G	A	T	E	E	K	G	K	T	S	E

GTG	CTG	AAC	GCT	GCC	AAG	GTG	CTT	CTC	ATT	GAG	ACA	CAG	AGA	TGC	AAC	AGC	AGA
V	L	N	A	A	K	V	L	L	I	E	T	Q	R	C	N	S	R

TAT	GTC	TAT	GAC	AAC	CTG	ATC	ACA	CCA	GCC	ATG	ATC	TGT	GCC	GGC	TTC	CTG	CAG
Y	V	Y	D	N	L	I	T	P	A	M	I	C	A	G	F	L	Q

5

1415	1424	1433	1442	1451	1460
GGG AAC GTC GAT TCT TGC CAG GGT GAC AGT GGA GGG CCT CTG GTC ACT TCG AAG					
-----	-----	-----	-----	-----	-----
G N V D S C Q G D S G G P L V T S K					
1469	1478	1487	1496	1505	1514
AAC AAT ATC TGG TGG CTG ATA GGG GAT ACA AGC TGG GGT TCT GGC TGT GCC AAA					
-----	-----	-----	-----	-----	-----
N N I W W L I G D T S W G S G C A K					
1523	1532	1541	1550	1559	1568
GCT TAC AGA CCA GGA GTG TAC GGG AAT GTG ATG GTA TTC ACG GAC TGG ATT TAT					
-----	-----	-----	-----	-----	-----
A Y R P G V Y G N V M V F T D W I Y					
1577	1586	1595	1604	1613	1622
CGA CAA ATG AGG GCA GAC GGC TAA TCC ACA TGG TCT TCG TCC TTG ACG TCG TTT					
-----	-----	-----	-----	-----	-----
R Q M R A D G *					
1631	1640	1649	1658	1667	1676
TAC AAG AAA ACA ATG GGG CTG GTT TTG CTT CCC CGT GCA TGA TTT ACT CTT AGA					
-----	-----	-----	-----	-----	-----
1685	1694	1703	1712	1721	1730
GAT GAT TCA GAG GTC ACT TCA TTT TTA TTA AAC AGT GAA CTT GTC TGG CAA AAA					
-----	-----	-----	-----	-----	-----
1739					
AAA AAA AAA A 3'					

FIG 2

```

1 gtcattattga acattccaga tacctatcat tactcgatgc tgttgataac agcaagatgg
61 ctttgaactc aggggtcacca ccagctattg gaccttacta tgaaaacccat ggataccaac
121 cggaaaaccc ctatcccgcga cagccactg tgggtcccccac tgtctacgag gtgcatccgg
181 ctgagtacta cccgtccccc gtgccccagt acgccccgag ggtcctgacg caggcttcca
241 acccgcgtcg ctgcacgcag cccaaatccc catccgggac agtgtgcacc tcaaagacta
301 agaaagcact gtgcatcacc ttgaccctgg ggaccttcct cgtgggagct gcgctggccg
361 ctggcctact ctggaagtgc atgggcagca agtgcctcaa ctctgggata gagtgcgact
421 cctcaggtag ctgcatcaac cctctaaact ggtgtgatgg cgtgtcacac tgccccggcg
481 gggaggacga gaatcgggtg gtctgcctct acggaccaa ctctatcctt cagatgtact
541 catctcagag gaagtcctgg caccctgtgt gccaaagacga ctggaacgag aactacgggc
601 gggcggcctg cagggacatg ggctataaga ataattttta ctctagccaa ggaatagtgg
661 atgacagcgg atccaccagc tttatgaaac tgaacacaag tgccggcaat gtcgatatct
721 ataaaaaact gtaccacagt gatgcctgtt cttcaaaaagc agtgggttct ttacgctgtt
781 tagcctgctg ggtcaacttg aactcaagcg gccagagcag gatcgtgggc ggtgagagcg
841 cgctcccggg ggccctggccc tggcagggtc gcctgcacgt ccagaacgct cactgtgtcg
901 gaggtcctat catcaccccc gagtggatcg tgacagccgc ccactgcgtg gaaaaacctc
961 ttaacaatcc atggcattgg acggcatttg cggggatttt gagacaatct ttcatgttct
1021 atggagcccg ataccaagta caaaaagtga tttctcatcc aaattatgac tccaagacca
1081 agaacaatga cattgctgctg atgaagctgc agaagcctct gactttcaac gacctagtga
1141 aaccagtgtg tctgcccac ccaggcatga tgctgcagcc agaacagctc tgctggattt
1201 ccgggtgggg ggccaccgag gagaaaggga agacctcaga agtgcctgaa gctgccaagg
1261 tgcttctcat tgagacacag agatgcaaca gcagatatgt ctatgacaac ctgatcacac
1321 cagccatgat ctgtgcccgc ttcttgcagg ggaacgtcga ttcttgccag ggtgacagtg
1381 gagggcctct ggtcacttcg aacaacaata tctggtggct gataggggat acaagctggg
1441 gttctggctg tgccaaagct tacagaccag gagtgtacgg gaatgtgatg gtattcacgg
1501 actggattta tcgacaaatg aaggcaaacg gctaattccac atggctcttcg tccttgacgt
1561 cgtttttaca gaaaacaatg gggctgggtt tgcttccccg tgcatgattt actcttagag
1621 atgattcaga ggtcacttca tttttattaa acagtgaact tgtctggctt tggcactctc
1681 tgccatactg tgcaggctgc agtggctccc ctgcccagcc tgctctccct aacccttgt
1741 ccgcaagggg tgatggccgg ctggttgttg gcaactggcg tcaattgtgg aaggaagagg
1801 gttggaggct gccccattg agatcttctt gctgagtcct ttccaggggc caattttgga
1861 tgagcatgga gctgtcactt ctcaactgct ggtgacttg agatgaaaaa ggagagacat
1921 ggaaggaggag acagccagggt ggcacctgca gcggctgccc tctggggcca cttggtagtg
1981 tccccagcct acttcacaag gggattttgc tgatgggttc ttagagcctt agcagccctg
2041 gatggtggcc agaaataaag ggaccagccc ttcatgggtg gtgacgtggt agtacttgt
2101 aaggggaaca gaaacatttt tgttcttatg gggtgagaat atagacagtg cccttgggtg
2161 gagggaagca attgaaaagg aacttgccct gagcactcct ggtgcaggtc tccacctgca
2221 cattgggtgg ggctcctggg agggagactc agccttcctc ctcatcctcc ctgacctgac
2281 tcctagcacc ctggagagtg aatgccccct ggtccctggc agggcgccaa gtttggcacc
2341 atgtcggcct cttcaggcct gatagtcatt ggaaattgag gtccatgggg gaaatcaagg
2401 atgctcagtt taaggtagac tgtttccatg ttatgtttct acacattgat ggtggtgacc
2461 ctgagttcaa agccatctt

```

SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS ORF

MALNSGSPPAIGPYENHGYQPENPYPQAQPTVVPTVYEVHPAQYYPSPVPQYAPRVLTAQASNPVVCTQPKSPSGTV
 CTSKTKKALCITLTGLTFLVGAALAAGLLWKFMGSKCSNSGIECDSSGTCINPSNWCDGVSHCPGGEDENRCVRLY
 GPNFILQMYSSQRKSWHPVCQDDWENYGRAACRDMGYKNNFYSSQGI VDDSGSTSFMKLNTSAGNVDIYKKLYHS
 DACSSKAVVSLRCLACGVNLNSSRQSRIVGGESALPGAWPWQVSLHVQNVHVCGGSIIITPEWIVTAAHCVEKPLNN
 PWHWTAFAFILRQSFMYGAGYQVQKVISHPNYDSKTKNNDIALMKLQKPLTFNDLVKPVCLPNPGMMLQPEQLCW
 ISGWGATEEKGKTSEVLNAKVLLIETQRCNSRYVYDNLITPAMICAGFLQGNVDSQGDSSGGLVTSNNNIWVLI
 GDTSWGSGCAKAYRPGVYGNVMVFTDWIYRQMKANG

FIG 3

15 16	30 31	45 46	60 61	75 76	90	
GTC1	MALNSGSPPAIGYY	ENHGYQENPYPAQP	TVVPTVYEVHPAQY	PSPVPQYAPRVLTOA	SNPVVCTQPKSPSGT	VCTSKTKKALCITLT
TMPRSS2	MALNSGSPPAIGYY	ENHGYQENPYPAQP	TVVPTVYEVHPAQY	PSPVPQYAPRVLTOA	SNPVVCTQPKSPSGT	VCTSKTKKALCITLT
91	105 106	120 121	135 136	150 151	165 166	180
GTC1	LGTFLVGAALAGLL	WKFMGSKCSNSGIEC	DSSGTCINPSNWCDCG	VSHCPGGEDENRCVR	LYGPNFILQVYSSQR	KSWHPVCQDDWNENY
TMPRSS2	LGTFLVGAALAGLL	WKFMGSKCSNSGIEC	DSSGTCINPSNWCDCG	VSHCPGGEDENRCVR	LYGPNFILQVYSSQR	KSWHPVCQDDWNENY
181	195 196	210 211	225 226	240 241	255 256	270
GTC1	GRAACRDMGYKNFY	SSQGI VDDSGSTSM	KLNTSAGNVDIYKKL	YHSDACSSKAVVSLR	CIACGVNLNSSRQSR	IVGGESALPGAWPWQ
TMPRSS2	GRAACRDMGYKNFY	SSQGI VDDSGSTSM	KLNTSAGNVDIYKKL	YHSDACSSKAVVSLR	CIACGVNLNSSRQSR	IVGGESALPGAWPWQ
271	285 286	300 301	315 316	330 331	345 346	360
GTC1	VSLHVQN VHVCGGSI	ITPEWIVTAAHCVEK	PLNNPWHWTAFAGIL	RQSFMYGAGYQVQK	VISHPNYDSKTKNND	IALMKLQKPLTFNDL
TMPRSS2	VSLHVQN VHVCGGSI	ITPEWIVTAAHCVEK	PLNNPWHWTAFAGIL	RQSFMYGAGYQVQK	VISHPNYDSKTKNND	IALMKLQKPLTFNDL
361	375 376	390 391	405 406	420 421	435 436	450
GTC1	VKPVCLPNPGMMLQP	EQLCWISGWGATEEK	GKTSEVLNAAKVLLI	ETQRCNSRVVYDNL	TPAMICAGFLQGNVD	SCQGDGSGPLVTSKN
TMPRSS2	VKPVCLPNPGMMLQP	EQLCWISGWGATEEK	GKTSEVLNAAKVLLI	ETQRCNSRVVYDNL	TPAMICAGFLQGNVD	SCQGDGSGPLVTSNN
451	465 466	480 481	495 496	510 511	525 526	540
GTC1	NIWWLIGDTSWGGC	AKAYRPGVYGNVMVF	TDWIYRQMRADG			
TMPRSS2	NIWWLIGDTSWGGC	AKAYRPGVYGNVMVF	TDWIYRQMKANG			

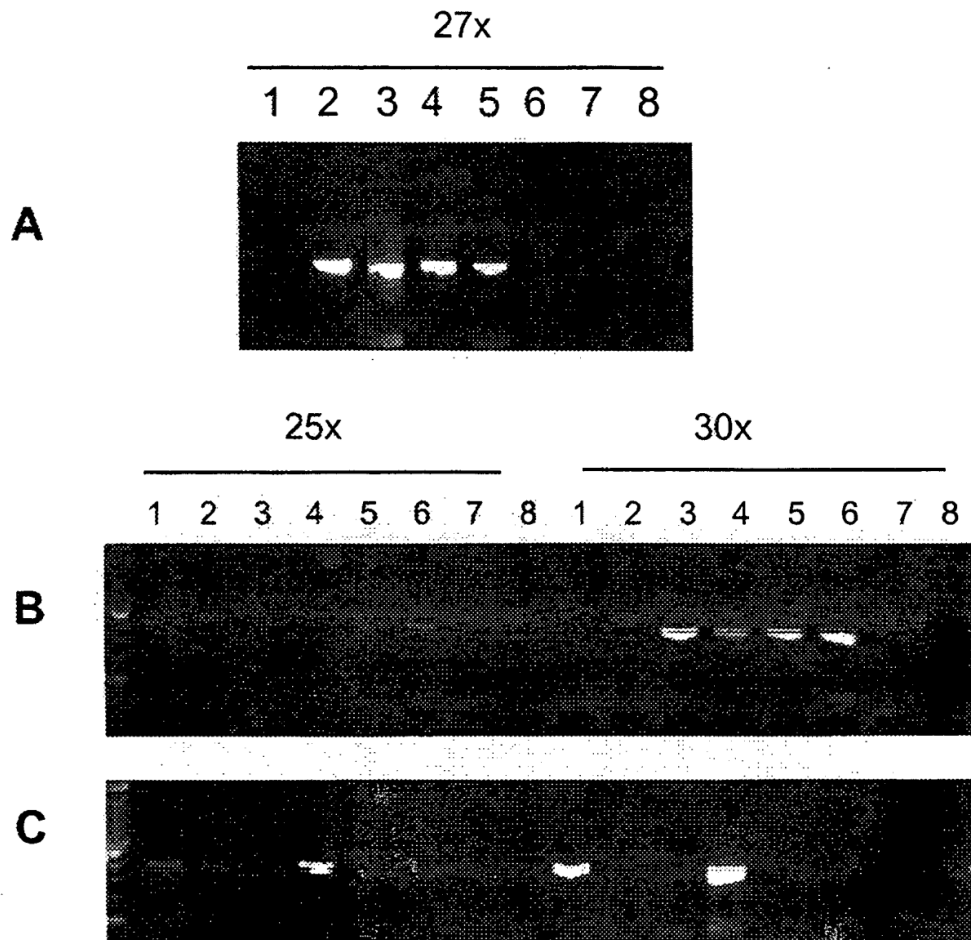
5

FIG 4

10

GATCTTCCTGCTGAGTCCTTTCCAGGGGCCAATTTTGGATGAGCATGGAGCTGTCACCTCTCAGCTGCTGGATGAC
 TTGAGATGAAAAAGGAGAGACATGGAAAGGGAGACAGCCAGGTGGCACCTGCAGCGGCTGCCCTCTGGGGCCACTT
 GGTAAGTGTCCCCAGCCTACCTCTCCACAAGGGGATTTTGCTGATGGGTTCTTANAGCCTTAGCAGCCCTGGATGGT
 GGCCAGAAATAAAGGGACCAGCCCTTCATGGGTGGTGACGTGGTANTCACTTGTAAGGGGAACAGAAACATTTTG
 TTCTTATGGGGTGAGAATATAGACAGTGCCCTTGGTGCGAGGGAAGCAATTGAAAAGGAACTTGCCCTGAGCACTC
 CTGGTGCA

FIG. 5



A

1. Cerebro
2. Próstata
3. LAPC-4 DA
4. LAPC-4 IA
5. LAPC-9 DA
6. HeLa
7. ADNc murino
8. Control neg.

B

1. Cerebro
2. Corazón
3. Riñón
4. Hígado
5. Pulmón
6. Páncreas
7. Placenta
8. Músculo esquelético

C

1. Colon
2. Ovario
3. Leucocitos
4. Próstata
5. Intestino delgado
6. Bazo
7. Testículos
8. Timo

FIG. 6

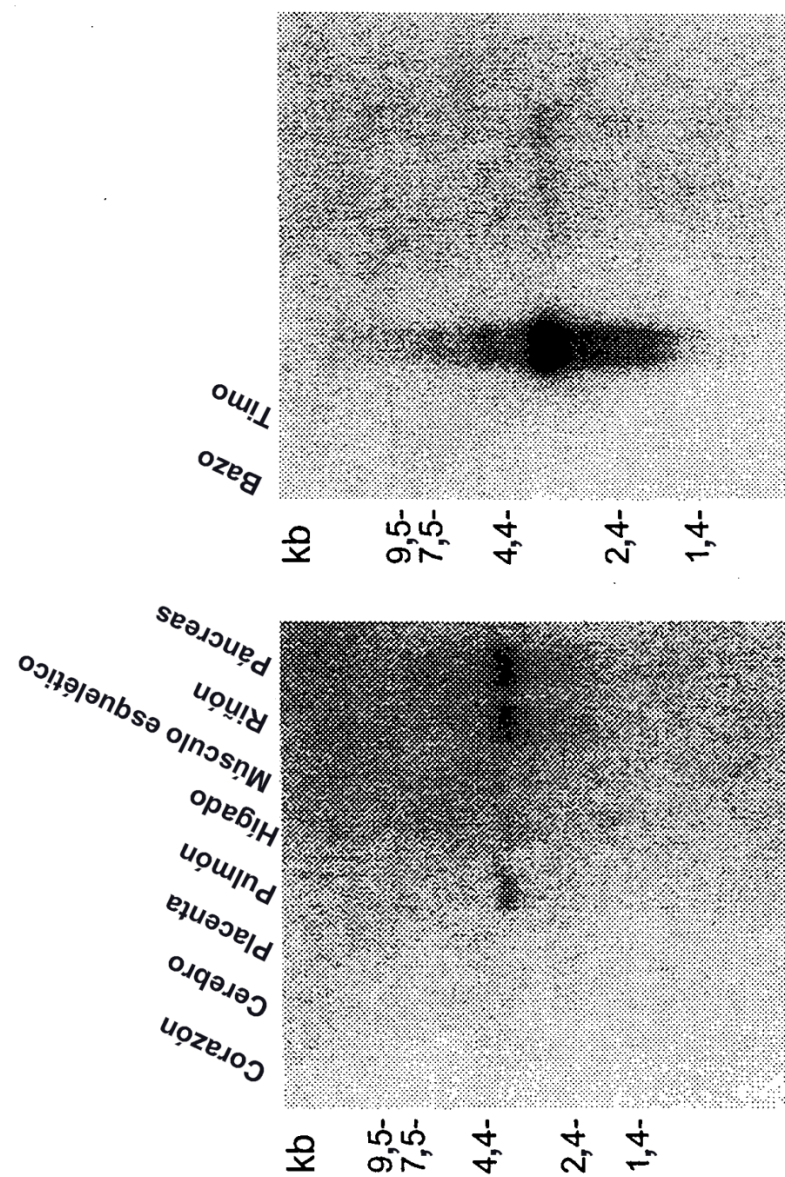


FIG. 7

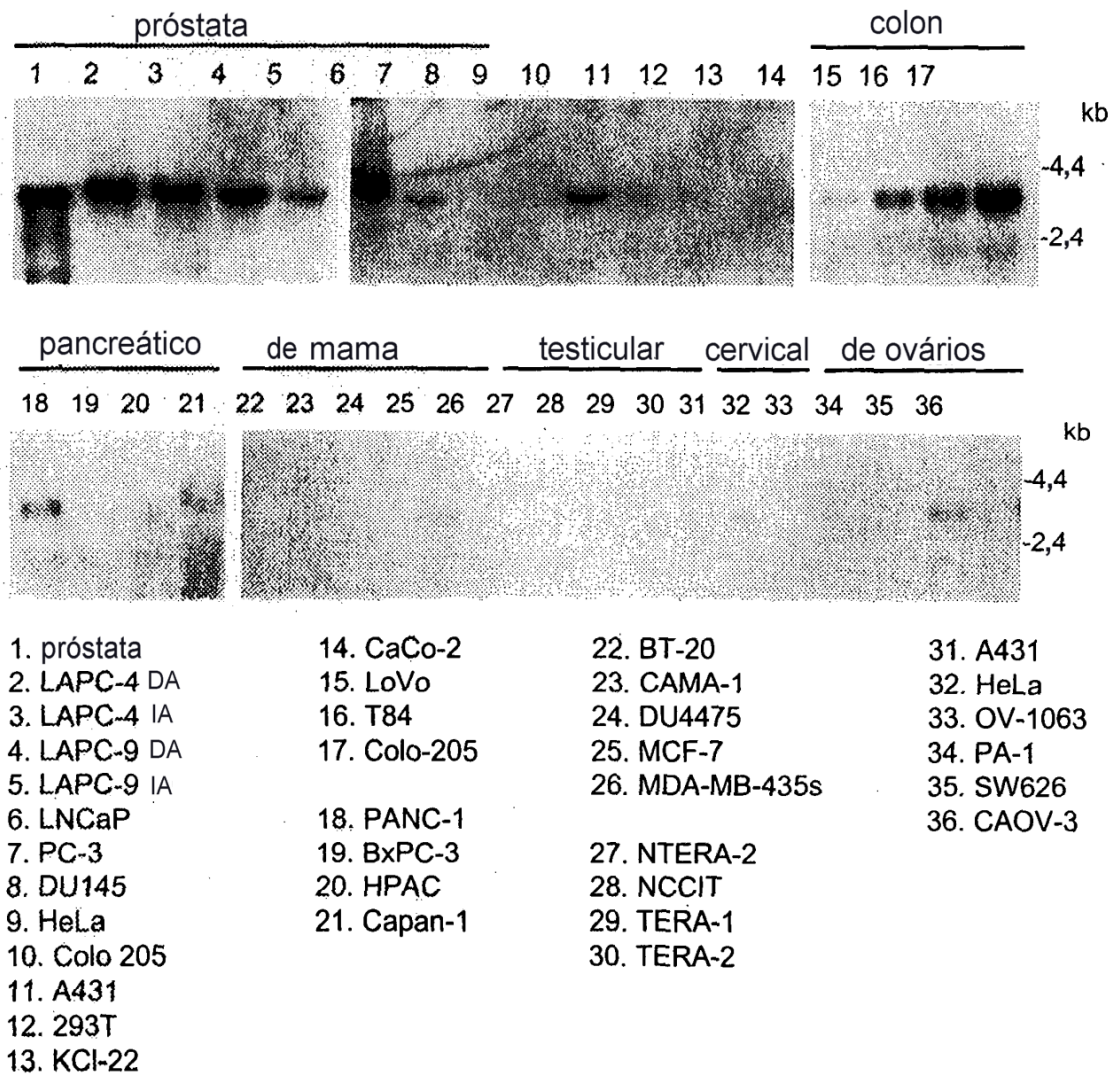


FIG. 8

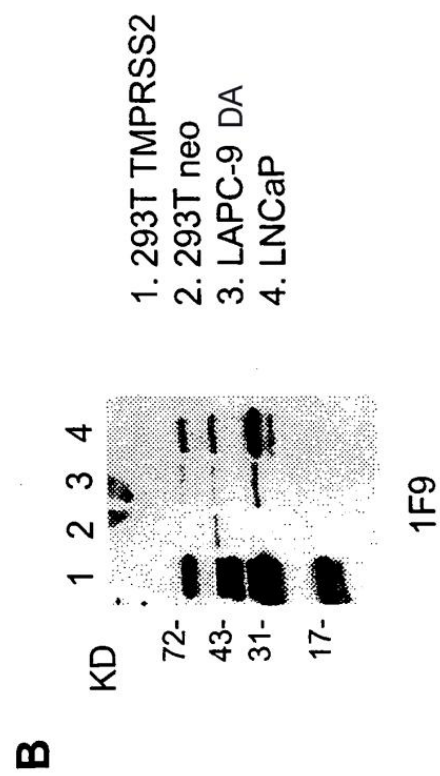
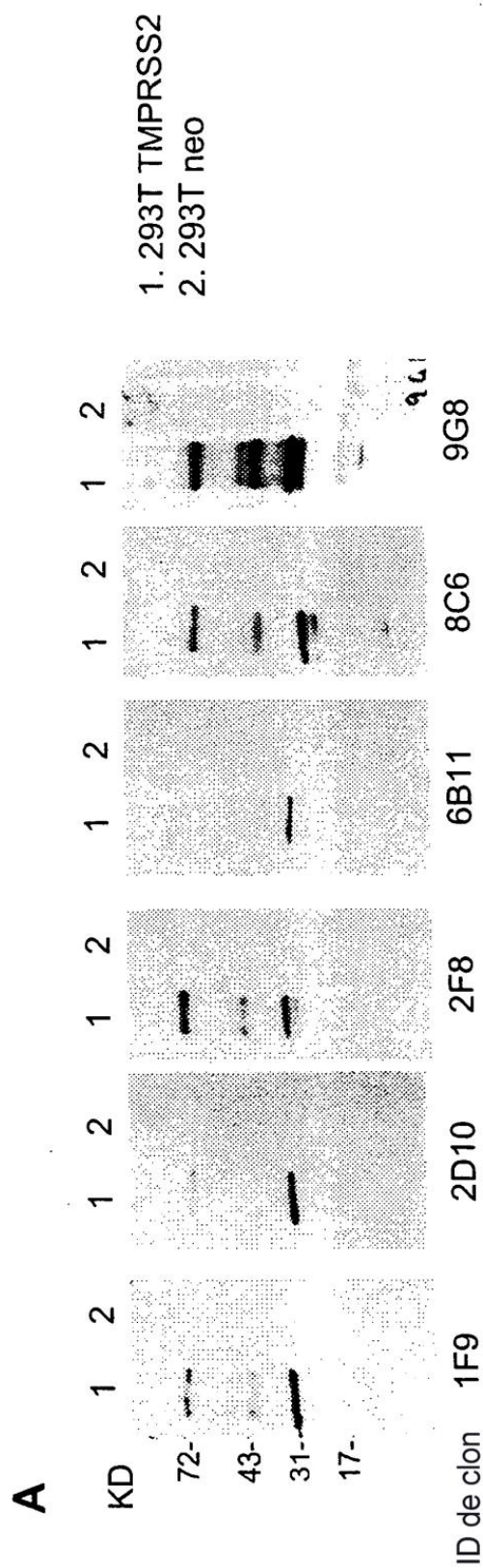
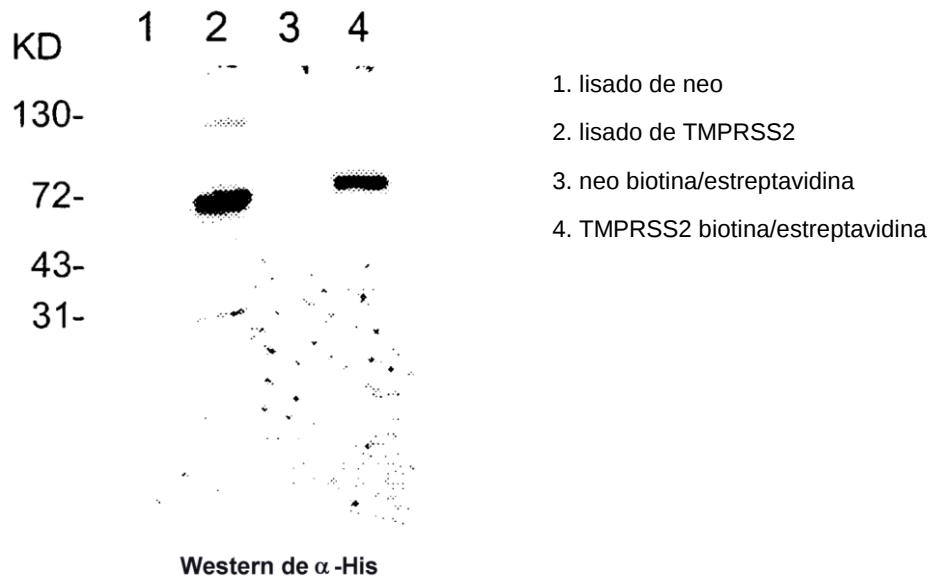


FIG. 9

A. En células 293T transfectadas



B. En células de cáncer de próstata:

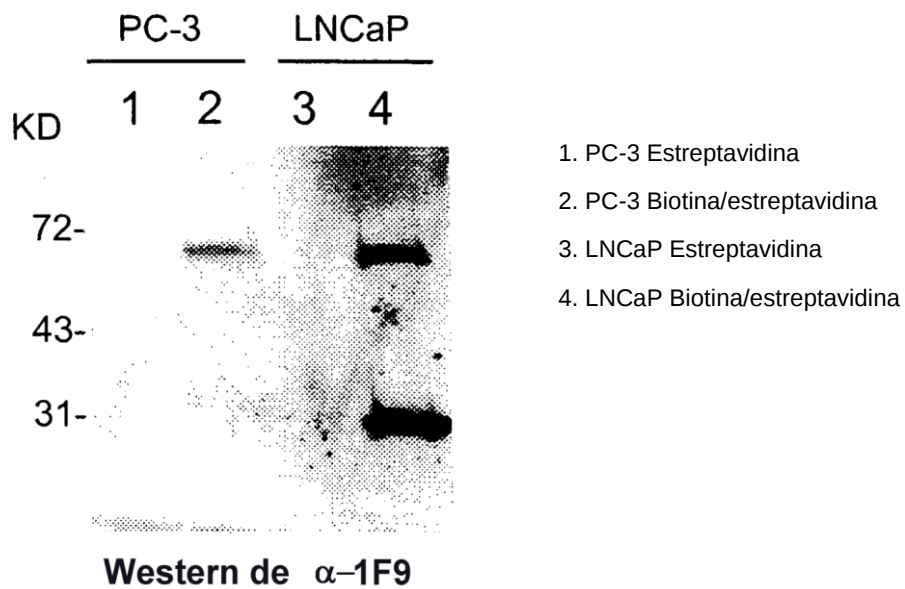


FIG. 10

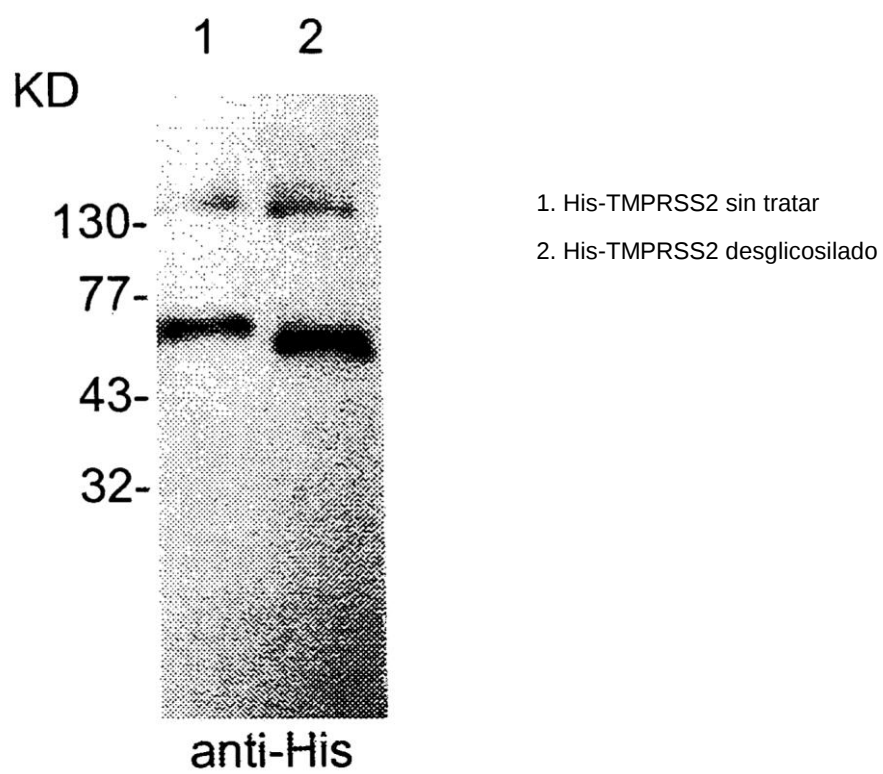
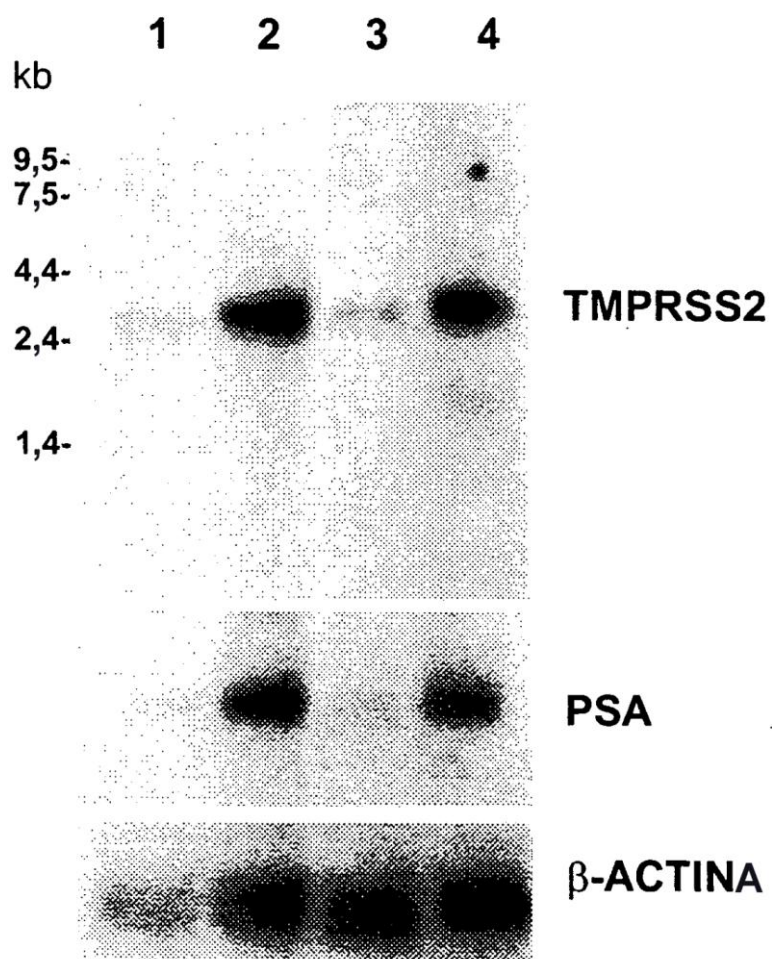
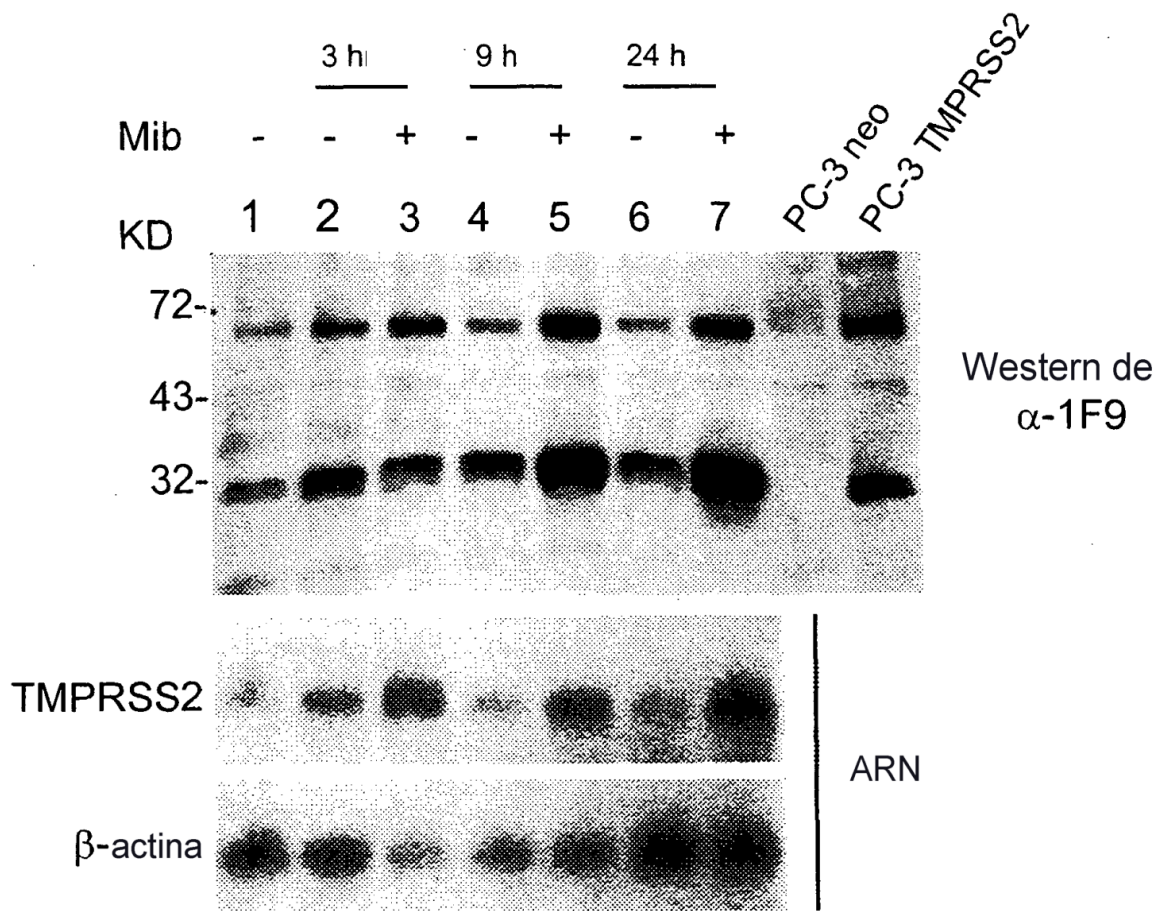


FIG. 11



Panel

1. LNCaP privadas de andrógeno 1 semana
2. LNCaP SBF
3. LNCaP privadas de andrógeno 24 h + mock 9 h
4. LNCaP privadas de andrógeno 24 h + Mib 9 h

FIG. 12

Las células LNCaP se privaron de andrógeno durante 1 semana (crecimiento en SBF tratado con carbón vegetal al 2%) y luego se estimularon con mibolerona 10 nM durante varios momentos de tiempo

FIG. 13

