

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 212**

51 Int. Cl.:
C12N 15/12 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08165936 .9**
96 Fecha de presentación: **05.10.2000**
97 Número de publicación de la solicitud: **2003202**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.12.2008**

54 Título: **RECEPTOR ACOPLADO A PROTEÍNA G REGULADO POSITIVAMENTE EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA Y USOS DEL MISMO.**

30 Prioridad:
05.10.1999 US 157902 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.12.2011

73 Titular/es:
**AGENSYS, INC.
1545 17TH STREET
SANTA MÓNICA 90404, US**

72 Inventor/es:
**Raitano, Arthur B.;
Afar, Daniel E. H.;
Jakobovits, Aya;
Faris, Mary;
Hubert, Rene S.;
Mitchell, Steve C. y
Saffran, Douglas C.**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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).

ES 2 371 212 T3

DESCRIPCIÓN

Receptor acoplado a proteína G regulado positivamente en el cáncer de próstata y usos del mismo

La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos número 60/157.902, presentada el 5 de octubre de 1999, cuyo contenido completo se incorpora en el presente documento por referencia.

Campo de la invención

La invención descrita en el presente documento se refiere a un nuevo gen y a su proteína codificada, denominada PHOR-1, y a procedimientos de diagnóstico y terapéuticos y composiciones útiles en la gestión de diversos cánceres que expresan PHOR-1, particularmente cánceres de próstata.

Antecedentes de la invención

El cáncer es la segunda causa principal de muerte en seres humanos después de la enfermedad coronaria. En todo el mundo, millones de personas mueren de cáncer cada año. En los Estados Unidos solamente, el cáncer causa la muerte de más de medio millón de personas anualmente, diagnosticándose alrededor de 1,4 millones de nuevos casos por año. Aunque las muertes de cardiopatía han estado disminuyendo significativamente, las resultantes del cáncer están aumentando en general. En la primera parte del próximo siglo se espera que el cáncer se convierta en la causa principal de muerte.

En todo el mundo, varios cánceres destacan como los que más muertes producen. En particular, los carcinomas del pulmón, próstata, mama, colon, páncreas y ovario representan las causas principales de muerte por cáncer. Estos y prácticamente todos los demás carcinomas comparten una característica letal común. Con muy pocas excepciones, la enfermedad metastásica de un carcinoma es mortal. Además, incluso para los pacientes con cáncer que inicialmente sobreviven a sus cánceres primarios, la experiencia común ha demostrado que sus vidas se ven drásticamente alteradas. Muchos pacientes con cáncer experimentan fuertes ansiedades movidas por la conciencia del potencial de recurrencia o fracaso del tratamiento. Muchos pacientes con cáncer experimentan un debilitamiento físico después del tratamiento. Muchos pacientes con cáncer experimentan una recurrencia.

En todo el mundo, el cáncer de próstata es el cuarto cáncer más prevalente en hombres. En Norteamérica y el Norte de Europa, es de lejos el cáncer masculino más común y es la segunda causa principal de muerte por cáncer en hombres. En Estados Unidos solamente, más de 40.000 hombres mueren anualmente de esta enfermedad —que ocupa el segundo lugar sólo después del cáncer de pulmón. A pesar de la magnitud de estas cifras, todavía no existe un tratamiento eficaz para el cáncer de próstata metastásico. La prostatectomía quirúrgica, la terapia de radiación, la terapia de supresión hormonal y la quimioterapia continúan siendo las modalidades de tratamiento principales. Desgraciadamente, estos tratamientos son ineficaces para muchos y con frecuencia se asocian con consecuencias indeseables.

En el frente de diagnóstico, la ausencia de un marcador de tumor de próstata que pueda detectar con precisión tumores localizados en fase temprana continúa siendo una limitación significativa en la gestión de esta enfermedad. Aunque el ensayo de PSA en suero ha sido una herramienta muy útil, se considera abiertamente que su especificidad y utilidad general tienen carencias en varios aspectos importantes.

El progreso en la identificación de marcadores específicos adicionales para el cáncer de próstata se ha mejorado por generación de xenoinjertos de cáncer de próstata que puedan recapitular diferentes fases de la enfermedad en ratones. Los xenoinjertos de LAPC (cáncer de próstata de Los Ángeles) son xenoinjertos de cáncer de próstata que han sobrevivido al pase en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) y han mostrado la capacidad de mimetizar la progresión de la enfermedad, incluyendo la transición de dependencia de andrógenos a independencia de andrógenos, y el desarrollo de lesiones metastásicas (Klein y col., 1997, Nat. Med.3: 402). Los marcadores de cáncer de próstata identificados más recientemente incluyen PCTA-1 (Su y col., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7252), el antígeno de células madre de próstata (PSCA) (Reiter y col., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 1735) y STEAP (Hubert y col., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 14523).

Aunque los marcadores identificados previamente tales como PSA, PSM, PCTA y PSCA han facilitado los esfuerzos para diagnosticar y tratar el cáncer de próstata, existe la necesidad de la identificación de marcadores y dianas terapéuticas adicionales para cánceres de próstata y relacionados con el fin de mejorar adicionalmente el diagnóstico y la terapia.

Sumario de la invención

Un receptor acoplado a proteína G específico de próstata regulado positivamente en el cáncer de próstata, denominado PHOR-1. La expresión de PHOR-1 está enormemente restringida a la próstata y está notablemente regulada positivamente en tumores de próstata. En la expresión de PHOR-1 en muestras de próstata normal/tumor relacionadas de pacientes con cáncer de próstata avanzado usando procedimientos de detección tanto de ARNm como de proteínas muestra un alto grado de expresión regulada positivamente en el tejido tumoral, sugiriendo que

PHOR-1 es un marcador útil para la detección del cáncer de próstata. El análisis de muestras normales/tumorales de otros pacientes con cáncer humanos demuestra la regulación positiva de la expresión de PHOR-1 en cánceres de riñón, uterino, de cuello uterino, de estómago y rectal también. Además, la expresión de PHOR-1 induce el crecimiento de colonias y modula el AMPc y la fosforilación de tirosina de formas indicativas de un papel funcional en la oncogénesis y la transformación, proporcionando una diana estratégica para la terapia del cáncer.

La estructura de PHOR-1 incluye siete supuestos dominios transmembrana que abarcan la secuencia proteica de 317 aminoácidos, PHOR-1 se expresa en la superficie celular, con el extremo N-terminal expuesto en la parte externa de la membrana celular. La proteína PHOR-1 es homóloga a una gran familia de receptores olfatorios que se expresan en el epitelio olfatorio y las neuronas. PHOR-1 presenta una actividad funcional que concuerda con otros receptores acoplados a proteína G, sugiriendo que PHOR-1 desempeña un papel crítico en la regulación de la función, proliferación y transformación celular.

Se describen en el presente documento varias estrategias potenciales para el tratamiento del cáncer de próstata y de otros cánceres que expresan PHOR-1. La orientación en superficie celular y la naturaleza acoplada a proteína G de este receptor presentan varias estrategias terapéuticas usando moléculas que se dirigen a PHOR-1 y su función, así como moléculas que se dirigen a otras proteínas, factores y ligandos que actúan a través del receptor PHOR-1. Estas estrategias terapéuticas incluyen terapia de anticuerpos con anticuerpos anti-PHOR-1, terapias con moléculas pequeñas y terapias con vacunas. Además, dada su expresión regulada positivamente en el cáncer de próstata, PHOR-1 es útil como marcador de diagnóstico, determinación de fase y/o pronóstico para el cáncer de próstata, y de forma similar, puede ser un marcador para otros cánceres que expresen este receptor.

Se describen en el presente documento los polinucleótidos correspondientes a o complementarios a todo o parte de los genes, ARNm y/o secuencias codificantes de PHOR-1, preferentemente en forma aislada, incluyendo polinucleótidos que codifican proteínas PHOR-1 y fragmentos de las mismas, ADN, ARN, híbridos de ADN/ARN y moléculas relacionadas, polinucleótidos u oligonucleótidos complementarios a los genes de PHOR-1 o secuencias de ARNm o partes de las mismas, y polinucleótidos u oligonucleótidos que hibridan con los genes de PHOR-1, los ARNm o con polinucleótidos que codifican PHOR-1. También se proporcionan medios para aislar ADNc y los genes que codifican PHOR-1. También se proporcionan moléculas de ADN recombinante que contienen polinucleótidos de PHOR-1, células transformadas o transducidas con dichas moléculas, y sistemas de huésped-vector para la expresión de productos génicos de PHOR-1.

Se describen proteínas PHOR-1 y fragmentos polipeptídicos de las mismas, así como anticuerpos que se unen a proteínas PHOR-1 y fragmentos polipeptídicos. Los anticuerpos incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales, anticuerpos murinos y de otros mamíferos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y totalmente humanos, anticuerpos marcados con un marcador detectable y anticuerpos conjugados con radionúclidos, toxinas u otras composiciones terapéuticas; también se describen procedimientos para detectar la presencia de polinucleótidos y proteínas PHOR-1 en diversas muestras biológicas, así como procedimientos para identificar células que expresan un PHOR-1. También se analizan diversas composiciones y estrategias terapéuticas, incluyendo particularmente terapia con anticuerpos, vacunas y moléculas pequeñas, para tratar cánceres de próstata, riñón, cuello uterino, útero, recto y estómago.

Se describe un procedimiento de identificación de una molécula que modula una actividad biológica de PHOR-1. El procedimiento comprende poner en contacto una molécula con una célula que exprese PHOR-1, ensayar una actividad biológica de PHOR-1 en presencia y ausencia de la molécula, y determinar si la actividad biológica de PHOR-1 se altera por la presencia de la molécula. Una alteración en la actividad biológica de PHOR-1 es indicativa de una molécula que modula una actividad biológica de PHOR-1. Preferentemente, la actividad biológica de PHOR-1 ensayada en el procedimiento comprende la fosforilación de tirosina, la acumulación de AMPc citosólico o la estimulación del crecimiento de colonias.

La Publicación Internacional Nº WO 99/06550 desvela las secuencias de EST 5' derivadas de ARNm que codifican proteínas secretadas expresadas en próstata, que pueden usarse para obtener ADNc y ADN genómicos correspondientes a las EST 5'. Las EST 5' pueden usarse como marcador en procedimientos de diagnóstico, forenses, de terapia génica y mapeo cromosómico.

Breve descripción de las figuras

FIG. 1A-1D. Secuencias de nucleótidos (SEC ID Nº: 1) y de aminoácidos deducida (SEC ID Nº: 2) de ADNc de PHOR-1 humano (clon GTH10). La supuesta metionina de inicio se muestra en tipo de letra en negrita. La secuencia presenta dos metioninas adyacentes en el inicio, presentando la secuencia que rodea la segunda metionina (ATG ATG G) una secuencia de Kozak. Los siete supuestos dominios transmembrana están recuadrados.

FIG. 2. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de PHOR-1 humano con HPRAJ70 (SEC ID Nº: 4) y RA1c (SEC ID Nº: 3) usando el programa ClustaW 1.7 (BCM Search Launcher). Los supuestos dominios transmembrana se indican en negrita o están recuadrados. El dominio recuadrado se identificó por homología con HPRAJ70 y RA1c. Los dominios en negrita se identificaron usando la herramienta web SOSUI en

<http://www.tuat.ac.jp/~mitaku/advsosui/submit.html>.

FIG. 3. Secuencia de nucleótidos (SEC ID N°: 5) de fragmento obtenido por SSH correspondiente al gen de PHOR-1.

FIG. 4. Representación esquemática de la topología macroscópica de la proteína PHOR-1 transmembrana.

5 FIG. 5A. Análisis de expresión por RT-PCR semicuantitativa que muestra la expresión de PHOR-1 humano restringida a próstata y xenoinjertos de cáncer de próstata. Se muestra: cerebro (carril 1), próstata normal (carril 2), LAPC-4 AD (carril 3), LAPC-4 AD 3 días post-castración (carril 4), LAPC-4 AD 14 días post-castración (carril 5), LAPC-4 AI (carril 6), células HeLa (carril 7) y control negativo (carril 8).

10 FIG. 5B. Análisis de expresión por RT-PCR semicuantitativa que muestra la expresión de PHOR-1 humano restringida a próstata. Se muestra: colon (carril 1), ovario (carril 2), leucocitos (carril 3), próstata normal (carril 4), intestino delgado (carril 5), bazo (carril 6), testículo (carril 7) y timo (carril 8).

Las FIGS. 6A-6C muestran los resultados del análisis de transferencia de Northern de la expresión de PHOR-1, demostrando una expresión restringida a próstata normal y xenoinjertos de cáncer de próstata.

15 FIG. 6A. Análisis de transferencia de Northern de PHOR-1 en corazón (carril 1), cerebro (carril 2), placenta (carril 3), pulmón (carril 4), hígado (carril 5), músculo esquelético (carril 6), riñón (carril 7) y páncreas (carril 8).

FIG. 6B. Análisis de transferencia de Northern de PHOR-1 en bazo (carril 1), timo (carril 2), próstata normal (carril 3), testículo (carril 4), ovario (carril 5), intestino delgado (carril 6), colon (carril 7) y leucocitos (carril 8).

FIG. 6C. Análisis de transferencia de Northern de PHOR-1 en próstata normal (carril 1), LAPC-4 AD (carril 2), LAPC-4 AI (carril 3), LAPC-9 AD (carril 4) y LAPC-9 AI (carril 5).

20 FIG. 7. Un análisis de transferencia puntual de ARNm de la expresión de PHOR- en 76 muestras diferentes de tejidos humanos que muestra una expresión exclusiva para próstata. Las posiciones representan los tejidos siguientes: A1 cerebro completo; A2 cerebelo, izquierdo; A3 sustancia negra; A4 corazón; A5 esófago; A6 colon, transversal; A7 riñón; A8 pulmón; A9 hígado; A10 HL60, leucemia; A11 cerebro fetal; B1 corteza cerebral; B2 cerebelo, derecho; B3 núcleo accumbens; B4 aorta; B5 estómago; B6 colon, descendente; B7 músculo esquelético; B8 placenta; B9 páncreas; B10 HeLa, S3; B11 corazón fetal; C1 lóbulo frontal; C2 cuerpo calloso; C3 tálamo; C4 aurícula, izquierda; C5 duodeno; C6 recto; C7 bazo; C8 vejiga; C9 glándula adrenal; C10 K562, leucemia; C11 riñón fetal; D1 lóbulo parietal; D2 amígdala; D3 glándula pituitaria; D4 aurícula, derecha; D5 yeyuno; D6 --; D7 timo; D8 útero; D9 glándula tiroidea; D10 MOLT-4, leucemia; D11 hígado fetal; E1 lóbulo occipital; E2 núcleo caudado; E3 médula espinal; E4 ventrículo, izquierdo; E5 íleon; E6 --; E7 leucocitos; E8 30 próstata; E9 glándula salivar; E10 RAJI, linfoma; E11 bazo fetal; F1 lóbulo temporal; F2 hipocampo; F3 --; F4 ventrículo, derecho; F5 ileocecal; F6 --; F7 ganglio linfático; F8 testículo; F9 glándula mamaria; F10 DAUDI, linfoma; F11 timo fetal; G1 giro paracentral; G2 médula oblongada; G3 --; G4 septo interventricular; G5 apéndice; G6 --; G7 médula ósea; G8 ovario; G9 --; G10 SW480, cáncer de colon; G11 pulmón fetal; H1 puente; H2 putamen; H3 --; H4 vértice del corazón; H5 colon, ascendente; H6 --; H7 tráquea; H8 --; H9 --; H10 A549, 35 cáncer de pulmón; H11 --.

FIG. 8A. Análisis de transferencia de Northern de la expresión de PHOR-1 en xenoinjertos de cáncer de próstata humano que muestran alto nivel de sobreexpresión de PHOR-1 en tumores de próstata. Próstata normal (carril 1); LAPC-4 AD (carril 2); LAPC-4 AI (carril 3); LAPC-9 AD (carril 4); LAPC-9 AI (carril 5).

40 FIG. 8B. Análisis de transferencia de Northern de la expresión de PHOR-1 en muestras de biopsia de pacientes humanos que muestran alto nivel de sobreexpresión de PHOR-1 en tumores de próstata. Próstata normal (carril 6); paciente 1, tejido adyacente normal (carril 7); paciente 1, tumor de Gleason 7 (carril 8); paciente 2, tejido adyacente normal (carril 9); paciente 1, tumor de Gleason 9 (carril 10); paciente 3, tejido adyacente normal (carril 11); paciente 3, tumor de Gleason 7 (carril 12); paciente 4, tejido adyacente normal (carril 13); paciente 4, tumor de Gleason 7 (carril 14).

45 FIG. 9A. Expresión de PHOR-1 en cáncer de próstata que muestra la regulación positiva por análisis de Northern en 5 de 7 (u 8 de 10, cuando se combina con la FIG. 9B) especímenes tumorales. Se muestran muestras de pacientes tumorales (T) y normales (N) relacionadas para los siguientes tipos tumorales: Gleason 7 (pareja de carril 1); Gleason 9 (pareja de carril 2); Gleason 7 (parejas de carriles 3-5); Gleason 6 (parejas de carriles 6-7); B representa hiperplasia prostática benigna (BPH); N representa especímenes normales 50 adicionales.

FIG. 9B. Expresión de PHOR-1 en cáncer de próstata que muestra la regulación positiva por análisis de transferencia puntual en 3 de 3 (u 8 de 10, cuando se combina con la FIG. 9A) especímenes tumorales. Se muestran muestras de pacientes tumorales (T) y normales (N) relacionadas para los siguientes tipos tumorales: Gleason 7 (pareja de puntos 8); Gleason 8 (pareja de puntos 9); Gleason 7 (parejas de puntos 10).

FIG. 10. Expresión de PHOR-1 en cánceres humanos demostrada por análisis de transferencia puntual de muestras relacionadas de ARN tumoral (T) y ARN normal (N) usando ADNc amplificados derivados de pacientes. Se encontró una regulación positiva de la expresión de PHOR-1 en 3 de 3 pacientes con cáncer de próstata, 6 de 14 pacientes con cáncer renal, 2 de 8 pacientes con cáncer uterino, 3 de 8 pacientes con cáncer de estómago y 7 de 7 pacientes con cáncer rectal.

FIG. 11A. Fotomicrografía que muestra la expresión de PHOR-1 en neoplasia intraepitelial prostática (PIN) por hibridación *in situ* con una ribosonda de PHOR-1 antisentido.

FIG. 11B. Fotomicrografía que muestra la expresión de PHOR-1 en tejido de cáncer de próstata por hibridación *in situ* con una ribosonda de PHOR-1 antisentido.

FIG. 12A. Fotomicrografía que muestra la expresión de PHOR-1 en cáncer de próstata por hibridación *in situ* con una ribosonda de PHOR-1 antisentido. Obsérvese la regulación positiva de la expresión respecto a la próstata normal, FIG. 12B.

FIG. 12B. Fotomicrografía que muestra la expresión de PHOR-1 en próstata normal por hibridación *in situ* con una ribosonda de PHOR-1 antisentido.

FIG. 13A. Expresión y detección de la proteína PHOR-1 en células PHOR-1-293T. Se transfectaron de forma transitoria células 293T con 10 µg de plásmido pCDNA4 HIS MAX PHOR-1, que contiene un epítipo Express y un marcador HIS fusionados al extremo N-terminal de la secuencia de PHOR-1, o control de vector, y se ensayaron para determinar la expresión de proteína PHOR-1 por citometría de flujo. Para la detección citométrica de flujo de proteína PHOR-1, se recogieron células 293T transfectadas con PHOR-1 y control de vector 2 días después de la transfección y se tiñeron con 10 µg/ml de AcM anti-Express (Invitrogen), seguido de conjugado con FITC anti-ratón, y después se analizaron en un citómetro de flujo Coulter EPICS XL. Se indican con flechas los perfiles fluorescentes respectivos de poblaciones celulares de control (línea continua) y transfectadas con PHOR-1 (línea de puntos). Estos resultados demuestran la expresión en superficie celular y el reconocimiento de proteína PHOR-1 en células transfectadas.

FIG. 13B. Expresión y detección de la proteína PHOR-1 en células PHOR-1-293T. Se transfectaron células 293T como se ha descrito para la FIG. 13A y se ensayaron para determinar la expresión de proteína PHOR-1 por inmunoprecipitación (IP) y transferencia de Western. Para los análisis de inmunoprecipitación y de Western, se recogieron células con PHOR-1 y control de vector y se lisaron en tampón RIPA (Tris 25 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Triton-X 100 al 1%, desoxicolato sódico al 0,5%, SDS al 1%, EDTA 2 mM, PMSF 100 µg/ml, leupeptina 2 µg/ml y ortovanadato sódico 2 mM) para la inmunoprecipitación, o en tampón de muestras SDS-PAGE 2X para análisis de Western de lisado de células completas (WCL). Los lisados con RIPA se preaclaron con perlas de agarosa con proteína G y después se inmunoprecipitaron con 4 µg de AcP de conejo anti-péptido de PHOR-1 purificado por afinidad y perlas de agarosa con proteína G. La proteína PHOR-1 inmunoprecipitada (IP) y la proteína PHOR-1 presente en los lisados de células completas (WCL) se detectaron por análisis de Western con AcP anti-Express seguido de un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón-HRP, y se visualizaron por quimioluminiscencia aumentada y exposición a una película autorradiográfica. La flecha indica la proteína PHOR-1 marcada con epítipo de 37 kD esperada detectada mediante el AcP anti-Express. También se detectó una mancha de alto peso molecular en células transfectadas con PHOR-1 pero no en células de control, que puede representar agregados de la proteína PHOR-1 inducidos por asociación de regiones transmembrana hidrófobas. Estos resultados demuestran la expresión en superficie celular y el reconocimiento de la proteína PHOR-1 en células transfectadas.

FIG. 14A. Detección citométrica de flujo de la expresión en superficie celular de la proteína PHOR-1 mediante un anticuerpo policlonal específico de PHOR-1. Se usó un AcP anti-péptido de PHOR-1 purificado por afinidad generado contra los aminoácidos 1-14 de la secuencia de PHOR-1 para detectar la proteína PHOR-1 marcada con epítipo expresada en células 293T transfectadas de forma transitoria. Se transfectaron células 293T con control de vector o plásmido pCDNA4-HIS-MAX PHOR-1 (10 µg) y se recogieron 2 días después. Las células se tiñeron después con 10 µg/ml de AcM anti-Express seguido de Ac secundario anti-ratón conjugado con FITC y se analizaron en un citómetro de flujo Coulter EPICS XL. Se indican con flechas los perfiles fluorescentes respectivos de poblaciones celulares de control (línea de puntos) y transfectadas con PHOR-1 (línea continua).

FIG. 14B. Detección citométrica de flujo de la expresión en superficie celular de proteína PHOR-1 mediante un anticuerpo policlonal específico de PHOR-1. Se usó un AcP anti-péptido de PHOR-1 purificado por afinidad generado contra los aminoácidos 1-14 de la secuencia de PHOR-1 para detectar la proteína PHOR-1 marcada con epítipo expresada en células 293T transfectadas de forma transitoria. Se transfectaron células 293T con control de vector o plásmido pCDNA4 HIS-MAX PHOR-1 (10 µg) y se recogieron 2 días después. Las células se tiñeron después con 10 µg/ml de AcP de conejo anti-PHOR-1 purificado por afinidad, seguido de un Ac secundario anti-conejo conjugado con FITC, y se analizaron en un citómetro de flujo Coulter EPICS XL. Se indican con flechas los perfiles fluorescentes respectivos de poblaciones celulares de control (línea de puntos) y transfectadas con PHOR-1 (línea continua).

FIG. 15. Reactividad específica de PHOR-1 de suero obtenido de ratones inmunizados con antígeno GST-PHOR-1. Se inmunizaron ratones Balb C con una proteína de fusión de glutatión-S-transferasa (GST)-PHOR-1 que codifica los aminoácidos 86-310 de la secuencia de la proteína PHOR-1. La reactividad específica de suero de ratón inmunizado contra la secuencia de la proteína PHOR-1 se determinó por transferencia de Western usando una proteína de fusión de proteína de unión a maltosa (MBP)-PHOR-1 que codifica los mismos aminoácidos que el antígeno diana. Se usó una dilución 1:500 de una extracción de sangre de ensayo representativa para sondear una transferencia de diversas cantidades de proteína MBP-PHOR-1 purificada (2 µl = ~100 ng de proteína de fusión) y lisados bacterianos inducidos. Se muestra el reconocimiento específico de la proteína MBP-PHOR-1 que demuestra anticuerpos específicos de PHOR-1 en el suero de ratón inmunizado.

FIG. 16A. Detección de expresión en superficie celular de PHOR-1 en células tumorales LNCaP. Las células LNCaP se tiñeron con una dilución 1:200 y una combinación de sueros obtenidos de ratones inmunizados con GST-PHOR-1 o con sueros preinmunes de ratón, seguido de anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con FITC anti-ratón. Las células teñidas se analizaron después en un citómetro de flujo Coulter EPICS XL. Se indican con flechas los perfiles fluorescentes respectivos de poblaciones de células teñidas con sueros preinmunes (línea continua) o sueros inmunizados con GST-PHOR-1 (línea de puntos). Estos resultados demuestran el reconocimiento de la expresión de PHOR-1 en superficie celular endógena en células de cáncer de próstata LNCaP.

FIG. 16B. Detección de la expresión en superficie celular de PHOR-1 en células tumorales LAPC9. Células tumorales LAPC9 preparadas a partir de un xenoinjerto de ratón SCID LAPC9 se tiñeron con una dilución 1:200 de una combinación de sueros obtenidos de ratones inmunizados con GST-PHOR-1 o con sueros preinmunes de ratón, seguido de anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con FITC anti-ratón. Las células teñidas se analizaron después en un citómetro de flujo Coulter EPICS XL. Se indican con flechas los perfiles fluorescentes respectivos de poblaciones de células teñidas con sueros preinmunes (línea continua) o sueros inmunizados con GST-PHOR-1 (línea de puntos). Estos resultados demuestran el reconocimiento de la expresión de PHOR-1 en superficie celular endógena en células de cáncer de próstata LAPC9.

FIG. 17. Expresión de PHOR-1 evaluada por traducción *in vitro* sin células. Se tradujo ADNc de control y ADNc de PHOR-1 *in vitro* usando lisados de reticulocitos de conejo. El ensayo de traducción *in vitro* sin células demuestra que el ADNc de PHOR-1 se traduce en una proteína de 38-42 kDa, que corresponde al peso molecular calculado de PHOR-1.

FIG. 18A. Fotomicrografía que muestra el análisis inmunohistoquímico usando anticuerpo policlonal de conejo anti-PHOR-1 (péptido 1; aminoácidos 1-14) sobre tejidos de cáncer de próstata fijados con formalina y embebidos en parafina.

FIG. 18B. Fotomicrografía que muestra el análisis inmunohistoquímico usando anticuerpo policlonal de conejo anti-PHOR-1 (péptido 1; aminoácidos 1-14) sobre la línea celular de cáncer de próstata fijada con formalina y embebida en parafina, LNCaP.

FIG. 18C. Fotomicrografía que muestra el análisis inmunohistoquímico usando un anticuerpo policlonal de conejo anti-PHOR-1 (péptido 1; aminoácidos 1-14) sobre tejidos de cáncer de próstata fijados con formalina y embebidos en parafina.

FIG. 18D. Fotomicrografía que muestra el análisis inmunohistoquímico usando un anticuerpo policlonal de conejo anti-PHOR-1 (péptido 1; aminoácidos 1-14) sobre próstata normal fijada con formalina y embebida en parafina.

FIG. 18E. Fotomicrografía que muestra el análisis inmunohistoquímico usando un anticuerpo policlonal de conejo anti-PHOR-1 (péptido 1; aminoácidos 1-14) sobre tejidos de cáncer de próstata fijados con formalina y embebidos en parafina.

FIG. 18F. Fotomicrografía que muestra el análisis inmunohistoquímico usando un anticuerpo policlonal de conejo anti-PHOR-1 (péptido 1; aminoácidos 1-14) sobre próstata normal fijada con formalina y embebida en parafina.

FIG. 19A. Fotomicrografía que muestra el análisis inmunohistoquímico usando un anticuerpo policlonal de conejo anti-PHOR-1 (péptido 1; aminoácidos 1-14) sobre células 293T fijadas con formalina y embebidas en parafina.

FIG. 19B. Fotomicrografía que muestra el análisis inmunohistoquímico usando un anticuerpo policlonal de conejo anti-PHOR-1 (péptido 1; aminoácidos 1-14) sobre células 293T fijadas con formalina y embebidas en parafina modificadas por ingeniería genética para que expresen PHOR-1.

FIG. 19C. Fotomicrografía que muestra el análisis inmunohistoquímico usando un anticuerpo policlonal de conejo anti-PHOR-1 (péptido 1; aminoácidos 1-14) sobre células PC3 fijadas con formalina y embebidas en parafina.

FIG. 19D. Fotomicrografía que muestra el análisis inmunohistoquímico usando un anticuerpo policlonal de conejo anti-PHOR-1 (péptido 1; aminoácidos 1-14) sobre células PC3 fijadas con formalina y embebidas en parafina modificadas por ingeniería genética para que expresen PHOR-1.

5 FIG. 19E. Fotomicrografía que muestra el análisis inmunohistoquímico usando un anticuerpo policlonal de conejo anti-PHOR-1 (péptido 1; aminoácidos 1-14) sobre tejido de cáncer de próstata fijado con formalina y embebido en parafina.

FIG. 19F. Fotomicrografía que muestra el análisis inmunohistoquímico usando un anticuerpo policlonal de conejo anti-PHOR-1 (péptido 1; aminoácidos 1-14) sobre células LNCaP fijadas con formalina y embebidas en parafina.

10 FIG. 20A. Análisis de Western de la alteración de la fosforilación de tirosina por PHOR-1. Células PC3 que expresan de forma estable neo o PHOR-1 en el vector retroviral pSR α se cultivaron en FBS al 1% durante una noche. Las células se dejaron después sin tratar o se trataron con FBS al 10% durante 3 min. Las células se lisaron y se analizaron por transferencia de Western con anti-fosfotirosina (UBI, Lake Placid, NY).

15 FIG. 20B. Análisis de Western de la alteración de la fosforilación de Erk por PHOR-1. Células PC3, que expresan de forma estable neo o PHOR-1 en el vector retroviral pSR α se procesaron como se ha descrito para la FIG. 19A. Las células se lisaron y se analizaron por transferencia de Western con AcM anti-fosfo-ERK (Cell Signal, Beverly, MA).

20 FIG. 20C. Células PC3 preparadas como se ha descrito para las FIG. 19A-B se sondaron también para Grb2. El revestimiento con AcM anti-Grb2 (Transduction Laboratories, San Diego, CA) muestra una carga de proteína equivalente.

25 FIG. 20D. Análisis de Northern de células PC3-neo y PC3-PHOR-1. Las células PC3 descritas en las FIGS. 19A-C anteriores se evaluaron para determinar la expresión de PHOR-1 por transferencia de Northern. Se extrajo ARN de células PC3-neo de control y células PC3 transducidas de forma estable con PHOR-1, y las transferencias de ARN se hibridaron usando una sonda de PHOR-1 (fragmento Xba-Ecor1 del clon GTH10). Se usó ARN de xenoinjertos de LAPC4 como control positivo (véase la FIG. 20). Los resultados muestran que el ARNm de PHOR-1 se expresa en células PC3-PHOR-1 transducidas con retrovirus pero no en células de control.

30 FIG. 20E. Transferencia de Northern que muestra la expresión de PHOR-1 en xenoinjertos de LAPC4. Se observa una expresión fuerte en las LAPC4 dependientes de andrógenos (AD) pero no en las LAPC4 independientes de andrógenos (AI).

FIG. 21A. Se analizaron células NIH-3T3 que expresaban de forma estable PHOR-1 para determinar su capacidad para formar colonias en agar blando. Se usaron células NIH-3T3 que expresaban de forma estable neo como controles negativos. El experimento se realizó por duplicado. El ensayo se evaluó 4 semanas después de la siembra en placas de las células.

35 FIG. 21B. Se analizaron células NIH-3T3 que expresaban de forma estable PHOR-1 para determinar su capacidad para formar colonias en agar blando. El experimento se realizó por duplicado. El ensayo se evaluó 4 semanas después de la siembra en placas de las células. El recuento de colonias muestra que PHOR-1 induce un aumento de 3 veces en la formación de colonias respecto al control de neo (FIG. 21A). Este aumento significativo se ha observado en 2 experimentos por separado. El resultado indica que la expresión de PHOR-1 en células NIH 3T3 induce un aumento de 3-4 veces en la formación de colonias en comparación con un aumento de 5 veces por el oncogén fuerte Ras (véase la FIG. 21 C), que sugiere que PHOR-1 tiene capacidades transformantes significativas.

40 FIG. 21C. Se analizaron células NIH-3T3 que expresaban de forma estable PHOR1 para determinar su capacidad para formar colonias en agar blando (FIG. 21B). Se usaron células NIH-3T3 que expresaban de forma estable Ras activado como controles positivos. El experimento se realizó por duplicado. El ensayo se evaluó 4 semanas después de la siembra en placas de las células.

FIG. 22. Secuencias de nucleótidos (SEC ID N°: 6) y de aminoácidos de la ORF deducida (SEC ID N°: 7) de A138218, un miembro de la familia de PHOR-1.

Descripción detallada de la invención

50 Un nuevo receptor acoplado a proteína G específico de próstata regulado positivamente en el cáncer de próstata se denomina PHOR-1. PHOR-1 parece expresarse exclusivamente en la próstata, y está notablemente regulado positivamente en tumores de próstata. La expresión de PHOR-1 en muestras de próstata normal/tumor relacionadas de pacientes con cáncer de próstata avanzado usando procedimientos de detección tanto de ARNm como de proteína muestra un alto grado de expresión regulada positivamente en el tejido tumoral, sugiriendo que PHOR-1 es un marcador útil para la detección del cáncer de próstata. Además, la expresión de PHOR-1 induce el crecimiento de

colonias, la fosforilación de tirosina y la modulación de CLAMP de formas indicativas de un papel funcional en la oncogénesis y la transformación, proporcionando una diana estratégica para la terapia del cáncer.

La proteína PHOR-1 es homóloga a una gran familia de receptores olfatorios que se expresan en el epitelio olfatorio y las neuronas. La orientación en superficie celular y la naturaleza acoplada a proteína G de este receptor presenta varias estrategias terapéuticas usando moléculas que se dirigen a PHOR-1 y su función. Estas estrategias terapéuticas incluyen terapia con anticuerpos con anticuerpos anti-PHOR-1, terapias con moléculas pequeñas y terapias con vacunas. Además, dada su expresión regulada positivamente en el cáncer de próstata, PHOR-1 es útil como marcador de diagnóstico, determinación de fase y/o pronóstico para el cáncer de próstata y, de forma similar, puede servir como marcador para otros cánceres que expresan este receptor.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos de la técnica, notaciones y otra terminología científica usada en el presente documento pretenden tener los significados entendidos comúnmente por los expertos en la materia a la que pertenece la presente invención. En algunos casos, los términos con significados comúnmente entendidos se definen en el presente documento por claridad y/o referencia rápida, y la inclusión de dichas definiciones en el presente documento no debe interpretarse necesariamente que representa una diferencia sustancial sobre lo que se entiende en general en la técnica. Las técnicas y procedimientos descritos o a los que se hace referencia en el presente documento están generalmente bien entendidos y se emplean comúnmente usando una metodología convencional por los expertos en la materia, tal como, por ejemplo, las metodologías de clonación molecular ampliamente utilizadas descritas en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2ª edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Según sea apropiado, los procedimientos que implican el uso de kits y reactivos disponibles en el mercado se llevan a cabo generalmente de acuerdo con protocolos y/o parámetros definidos por el fabricante a menos que se señale otra cosa.

Como se usan en el presente documento, las expresiones "cáncer de próstata avanzado", "cáncer de próstata localmente avanzado", "enfermedad avanzada" y "enfermedad localmente avanzada" significan cánceres de próstata que se han extendido a través de la cápsula prostática, y pretenden incluir enfermedad en fase C de acuerdo con el sistema de la Asociación Urológica Americana (AUA), enfermedad en fase C1 C2 de acuerdo con el sistema de Whitmore-Jewett y enfermedad en fase T3-T4 y N+ de acuerdo con el sistema TNM (tumor, nódulo, metástasis). En general, la cirugía no está recomendada para pacientes con enfermedad localmente avanzada, y estos pacientes tienen desenlaces sustancialmente menos favorables en comparación con pacientes que tienen un cáncer de próstata clínicamente localizado (confiando a un órgano). La enfermedad localmente avanzada se identifica clínicamente por pruebas palpables de induración más allá del borde lateral de la próstata, o asimetría o induración por encima de la base de la próstata. El cáncer de próstata localmente avanzado se diagnostica en la actualidad patológicamente después de la prostatectomía radical si el tumor invade o penetra en la cápsula prostática, se extiende hacia el margen quirúrgico o invade las vesículas seminales.

Como se usan en el presente documento, las expresiones "cáncer de próstata metastásico" y "enfermedad metastásica" significan cánceres de próstata que se han propagado a los ganglios linfáticos regionales o a sitios distantes y pretenden incluir enfermedad en fase D de acuerdo con el sistema AUA y fase TxNxM+ de acuerdo con el sistema TNM. Como en el caso del cáncer de próstata localmente avanzado, la cirugía generalmente no está indicada para pacientes con enfermedad metastásica, y la terapia hormonal (supresión de andrógenos) es la modalidad de tratamiento preferida. Los pacientes con cáncer de próstata metastásico desarrollan en última instancia un estado resistente a andrógenos en los 12 a 18 meses siguientes al inicio del tratamiento, y aproximadamente la mitad de estos pacientes mueren en los 6 meses siguientes a esto. El sitio más común para la metástasis del cáncer de próstata es el hueso. Las metástasis óseas del cáncer de próstata son, teniendo en cuenta todos los factores, característicamente osteoblásticas más que osteolíticas (es decir, dan como resultado la formación de hueso neta). Las metástasis óseas se encuentran más frecuentemente en la columna, seguida de fémur, pelvis, tórax, cráneo y húmero. Otros sitios comunes para metástasis incluyen ganglios linfáticos, pulmón, hígado y cerebro. El cáncer de próstata metastásico se diagnostica típicamente por linfadenectomía pélvica abierta o laparoscópica, exploraciones con radionúclidos corporales completas, radiografía esquelética y/o biopsia de lesiones óseas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "polinucleótido" significa una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases o pares de bases de longitud, ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido, y pretende incluir formas mono y bicatenarias de ADN.

Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" significa un polímero de al menos 10 aminoácidos. Durante toda la memoria descriptiva, se usan designaciones convencionales de tres letras o de una sola letra para los aminoácidos.

Como se usan en el presente documento, los términos "hibridar", "que hibrida", "hibrida" y similares, usados en el contexto de los polinucleótidos, pretenden referirse a condiciones de hibridación convencionales, preferentemente tales como hibridación en formamida al 50%/SSC 6X/SDS al 0,1%/ADNmc 100 µg/ml, en las que las temperaturas para la hibridación están por encima de 37°C, y las temperaturas para el lavado en SSC 0,1X/SDS al 0,1% están por encima de 55°C y, más preferentemente, a condiciones de hibridación rigurosas.

La "rigurosidad" de las reacciones de hibridación puede determinarse fácilmente por un experto en la materia, y generalmente es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, temperatura de lavado y concentración salina. En general, sondas de mayor tamaño requieren mayores temperaturas para una hibridación apropiada, mientras que sondas más cortas requieren temperaturas más bajas. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado para volver a hibridar cuando están presentes cadenas complementarias en un entorno por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor sea el grado de homología deseado entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor será la temperatura relativa que puede usarse. Como resultado, se deduce que mayores temperaturas relativas tenderían a hacer que las condiciones de reacción fueran más rigurosas, mientras que temperaturas menores las harían menos rigurosas. Para detalles adicionales y una explicación de la rigurosidad de las reacciones de hibridación, véase Ausubel y col, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

Las "condiciones rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad", como se definen en el presente documento, pueden identificarse por las que: (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para lavado, por ejemplo, cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecilsulfato sódico al 0,1% a 50°C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1%/Ficoll al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C; o (3) emplean formamida al 50%, SSC 5x (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, solución de Denhardt 5x, ADN de esperma de salmón sonificado (50 µg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en SSC 0,2x (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida al 50% a 55°C, seguido de un lavado de alta rigurosidad que consistente en SSC 0,1x que contiene EDTA a 55°C.

Las "condiciones moderadamente rigurosas" pueden identificarse como se describe por Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de una solución de lavado y unas condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % SDS) menos rigurosas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas es la incubación durante una noche a 37°C en una solución que comprende: formamida al 20%, SSC 5x (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), solución de Denhardt 5x, sulfato de dextrano al 10% y ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado 20 mg/ml, seguido de lavado de los filtros en SSC 1x a aproximadamente 37-50°C. El experto en la materia reconocerá cómo ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc. según sea necesario para dar cabida a factores tales como la longitud de sonda y similares.

En el contexto de comparaciones de secuencias de aminoácidos, el término "identidad" se usa para expresar el porcentaje de restos de aminoácidos en las mismas posiciones relativas que son iguales. También en este contexto, el término "homología" se usa para expresar el porcentaje de restos de aminoácidos en las mismas posiciones relativas que son idénticos o similares, usando los criterios de aminoácidos conservados del análisis BLAST, como se entiende en general en la técnica. Por ejemplo, pueden generarse valores de % de identidad mediante WU-BLAST-2 (Altschul y col, Methods in Enzymology, 266: 460-480 (1996): <http://blast.wustl.edu/blast/README.html>). Se proporcionan a continuación detalles adicionales respecto a sustituciones de aminoácidos que se consideran conservativas según dichos criterios.

Se proporcionan definiciones adicionales durante todas las subsecciones que siguen a continuación.

Polinucleótidos de PHOR-1

Un aspecto de la invención proporciona polinucleótidos correspondientes a o complementarios a todo o parte de un gen de PHOR-1, ARNm y/o secuencia codificante, preferentemente en forma aislada, incluyendo polinucleótidos que codifican una proteína PHOR-1 y fragmentos de los mismos, ADN, ARN, híbrido de ADN/ARN y moléculas relacionadas, polinucleótidos u oligonucleótidos complementarios a un gen de PHOR-1 o secuencia de ARNm o una parte de los mismos, y polinucleótidos u oligonucleótidos que hibridan con un gen de PHOR-1, ARNm o con un polinucleótido que codifica PHOR-1 (en conjunto, "polinucleótidos de PHOR-1"). Como se usa en el presente documento, el gen y la proteína PHOR-1 pretenden incluir los genes y proteínas PHOR-1 específicamente descritos en el presente documento y los genes y proteínas correspondientes a otras proteínas PHOR-1 y variantes estructuralmente similares de lo anterior. Dichas otras proteínas PHOR-1 y variantes tendrán generalmente secuencias codificantes que son altamente homólogas a la secuencia codificante de PHOR-1, y preferentemente compartirán una identidad de aminoácidos de al menos aproximadamente el 50% y una homología de aminoácidos de al menos aproximadamente el 60% (usando criterios de BLAST), compartiendo más preferentemente una homología del 70% o mayor (usando criterios de BLAST).

Un polinucleótido de PHOR-1 es un polinucleótido de PHOR-1 que tiene la secuencia mostrada en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 1). Un polinucleótido de PHOR-1 puede comprender un polinucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de PHOR-1 humano como se muestra en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 1), en la que T también puede ser U; un polinucleótido que codifica toda o parte de la proteína PHOR-1; una secuencia complementaria a lo anterior; o un fragmento polinucleotídico de cualquiera de los anteriores. Una realización de la invención comprende un polinucleótido que tiene una secuencia que se muestra en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 1) del número de resto de nucleótido 133 al número de resto de nucleótido 1083. También se conoce del número de resto de nucleótido 388 al

número de resto de nucleótido 1062, en el que T también puede ser U. Otra realización comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido PHOR-1 cuya secuencia está codificada por el ADNc contenido en el plásmido p101P3A11 según se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo el 2 de julio de 1999 como N° de Acceso PTA-312. Un polinucleótido que es capaz de hibridar en condiciones de hibridación rigurosas con el ADNc de PHOR-1 humano se muestra en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 1) o puede ser un fragmento polinucleotídico del mismo.

Lo descrito en el presente documento incluye polinucleótidos de PHOR-1 que codifican porciones específicas de la secuencia de ARNm de PHOR-1, tales como las que codifican la proteína y fragmentos de la misma. Por ejemplo, las realizaciones representativas de la invención desveladas en el presente documento incluyen: polinucleótidos que codifican de aproximadamente el aminoácido 1 a aproximadamente el aminoácido 10 de la proteína PHOR-1 mostrada en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2), polinucleótidos que codifican de aproximadamente el aminoácido 20 a aproximadamente el aminoácido 30 de la proteína PHOR-1 mostrada en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2), polinucleótidos que codifican de aproximadamente el aminoácido 30 a aproximadamente el aminoácido 40 de la proteína PHOR-1 mostrada en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2), polinucleótidos que codifican de aproximadamente el aminoácido 40 a aproximadamente el aminoácido 50 de la proteína PHOR-1 mostrada en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2), polinucleótidos que codifican de aproximadamente el aminoácido 50 a aproximadamente el aminoácido 60 de la proteína PHOR-1 mostrada en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2), polinucleótidos que codifican de aproximadamente el aminoácido 60 a aproximadamente el aminoácido 70 de la proteína PHOR-1 mostrada en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2), polinucleótidos que codifican de aproximadamente el aminoácido 70 a aproximadamente el aminoácido 80 de la proteína PHOR-1 mostrada en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2), polinucleótidos que codifican de aproximadamente el aminoácido 80 a aproximadamente el aminoácido 90 de la proteína PHOR-1 mostrada en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2) y polinucleótidos que codifican de aproximadamente el aminoácido 90 a aproximadamente el aminoácido 100 de la proteína PHOR-1 mostrada en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2), etc. Siguiendo este esquema, los polinucleótidos (de al menos 10 aminoácidos) que codifican porciones de la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 100-317 de la proteína PHOR-1 mostrada en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2) son realizaciones típicas de la invención. Los polinucleótidos que codifican porciones de mayor tamaño de la proteína PHOR-1 también se contemplan. Por ejemplo, pueden generarse polinucleótidos que codifican de aproximadamente el aminoácido 1 (o 20 ó 30 ó 40, etc.) a aproximadamente el aminoácido 20 (o 30 ó 40 ó 50, etc.) de la proteína PHOR-1 mostrada en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2) mediante una diversidad de procedimientos bien conocidos en la técnica.

Además, los desvelados en el presente documento incluyen fragmentos de polinucleótidos de PHOR-1 que codifican uno o más de los motivos biológicos contenidos dentro de la secuencia de la proteína PHOR-1. Típicamente, los fragmentos de polinucleótidos de la invención pueden codificar una o más de las regiones de PHOR-1 que muestran homología con HPRAJ70 o RA1c, como se muestra en la FIG. 2. Los fragmentos de polinucleótidos típicos pueden codificar una o más secuencias distintivas de GPCR o secuencias distintivas de receptor olfatorio. Los fragmentos de polinucleótidos típicos pueden codificar secuencias que sean únicas para una o más variantes de corte y empalme alternativas de PHOR-1. En otra realización de la invención, los fragmentos de polinucleótidos típicos pueden incluir una porción de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N°: 1, por ejemplo, del número de resto de nucleótido 133 al número de resto de nucleótido 1083.

Los polinucleótidos de los párrafos anteriores tienen varios usos específicos diferentes. Como se muestra que PHOR-1 está sobreexpresado en cánceres de próstata y otros cánceres, estos polinucleótidos pueden usarse en procedimientos que evalúen el estado de productos génicos de PHOR-1 en tejidos normales frente a cancerosos. Típicamente, los polinucleótidos que codifican regiones específicas de la proteína PHOR-1 pueden usarse para evaluar la presencia de alteraciones (tales como deleciones, inserciones, mutaciones puntuales etc.) en regiones específicas (tales como regiones que contienen un dominio transmembrana) de los productos génicos de PHOR-1. Los ensayos ejemplares incluyen tanto ensayos de RT-PCR, así como análisis de polimorfismos de conformación monocatenaria (SSCP) (véase, por ejemplo, Marrogi y col, J. Cutan. Pathol. 26 (8): 369-378 (1999) utilizando ambos polinucleótidos que codifican regiones específicas de una proteína para examinar estas regiones dentro de la proteína. También están disponibles ensayos y procedimientos para analizar secuencias para detectar polimorfismos de un solo nucleótido (Irizarry, y col, 2000, Nature Genetics 26 (2): 223-236.

También se describen en el presente documento ADN genómico, ADNc, ribozimas y moléculas antisentido, incluyendo moléculas antisentido de morfolino, así como moléculas de ácido nucleico basadas en una cadena principal alternativa o que incluyen bases alternativas, ya sean derivadas de fuentes naturales o sintetizadas. Por ejemplo, las moléculas antisentido pueden ser ARN u otras moléculas, incluyendo ácidos péptido nucleicos (PNA) o moléculas distintas de ácidos nucleicos, tales como derivados de fosforotioato, que se unen específicamente al ADN o ARN de una forma dependiente del par de bases. Un experto en la materia puede obtener fácilmente estas clases de moléculas de ácido nucleico usando los polinucleótidos y secuencias polinucleotídicas de PHOR-1 desvelados en el presente documento.

La tecnología antisentido implica la administración de oligonucleótidos exógenos que se unen a un polinucleótido diana localizado dentro de las células. El término "antisentido" se refiere al hecho de que dichos oligonucleótidos son complementarios a sus dianas intracelulares, por ejemplo, PHOR-1. Véase, por ejemplo, Jack Cohen, OLIGODEOXYNUCLEOTIDES, Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, 1989; y Synthesis 1: 1-5 (1988). Los oligonucleótidos antisentido de PHOR-1 descritos en el presente documento incluyen derivados tales como S-oligonucleótidos (derivados de fosforotioato o S-oligonucleótidos, véase Jack Cohen, anteriormente), que

presentan una acción inhibitoria del crecimiento celular del cáncer aumentada. Los S-oligonucleótidos (nucleósido fosforotioatos) son análogos isoelectrónicos de un oligonucleótido (O-oligonucleótido) en los que un átomo de oxígeno que no está formando un enlace del grupo fosfato se sustituye por un átomo de azufre. Los S-oligonucleótidos pueden prepararse por tratamiento de los O-oligonucleótidos correspondientes con 3H-1,2-benzoditioil-3-ona-1,1-dióxido, que es un reactivo de transferencia de azufre. Véase Iyer, R. P. y col., J. Org. Chem. 55: 4693-4698 (1990); y Iyer, R. P. y col., J. Am. Chem. Soc. 112: 1253-1254 (1990). Los oligonucleótidos antisentido de PHOR-1 adicionales incluyen oligonucleótidos antisentido de morfolino conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Partridge y col., 1996, Antisense & Nucleic Acid Drug Development 6: 169-175).

Los oligonucleótidos antisentido de PHOR-1 típicamente pueden ser ARN o ADN que es complementario a y que hibrida de forma estable con los primeros 100 codones N-terminales o los últimos 100 codones C-terminales, o que solapa con el sitio de inicio ATG del genoma de PHOR-1 o el ARNm correspondiente. Aunque no es necesaria una complementariedad absoluta, se prefieren altos grados de complementariedad. El uso de un oligonucleótido complementario a esta región permite la hibridación selectiva con ARNm de PHOR-1 y no con ARNm que especifiquen otras subunidades reguladoras de proteína quinasa. Preferentemente, los oligonucleótidos antisentido de PHOR-1 son un fragmento de 15 a 30 monómeros de la molécula de ADN antisentido que tienen una secuencia que hibrida con ARNm de PHOR-1. Opcionalmente, el oligonucleótido antisentido de PHOR-1 es un oligonucleótido de 30 monómeros que es complementario a una región en los primeros 10 codones N-terminales y los últimos 10 codones C-terminales de PHOR-1. Como alternativa, las moléculas antisentido se modifican para emplear ribozimas en la inhibición de la expresión de PHOR-1. L. A. Couture y D. T. Stinchcomb; Trends Genet 12: 510-515 (1996).

También se describen en el presente documento cebadores y parejas de cebadores que permiten la amplificación específica de los polinucleótidos de la invención o de cualquier parte específica de los mismos, y sondas que hibridan selectivamente o específicamente con moléculas de ácido nucleico 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, un quelante de metales o enzima. Dichas sondas y cebadores pueden usarse para detectar la presencia de un polinucleótido de PHOR-1 en una muestra y como medio para detectar una célula que expresa una proteína PHOR-1.

Los ejemplos de dichas sondas incluyen polipéptidos que comprenden toda o parte de la secuencia de ADNc de PHOR-1 humano mostrada en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 1). Los ejemplos de parejas de cebadores capaces de amplificar específicamente ARNm de PHOR-1 se describen también en los Ejemplos a continuación. Como entenderá el experto en la materia, una gran cantidad de cebadores y sondas diferentes pueden prepararse basándose en las secuencias proporcionadas en el presente documento y usarse eficazmente para amplificar y/o detectar ARNm de PHOR-1.

Como se usa en el presente documento, se dice que un polinucleótido está "aislado" cuando está sustancialmente separado de polinucleótidos contaminantes que se corresponden con o son complementarios a genes distintos del gen de PHOR-1, o que codifican polipéptidos distintos del producto génico de PHOR-1 o fragmentos del mismo. Un experto en la materia puede emplear fácilmente procedimientos de aislamiento de ácidos nucleicos para obtener un polinucleótido de PHOR-1 aislado.

Los polinucleótidos de PHOR-1 descritos en el presente documento son útiles para una diversidad de fines, incluyendo, pero sin limitación, su uso como sondas y cebadores para la amplificación y/o detección del gen o genes de PHOR-1, ARNm o fragmentos de los mismos; como reactivos para el diagnóstico y/o pronóstico de cáncer de próstata y otros cánceres; como herramientas para identificar moléculas que inhiban la entrada de calcio específicamente en células de próstata; como secuencias codificantes capaces de dirigir la expresión de polipéptidos PHOR-1; como herramientas para modular o inhibir la expresión del gen o genes de PHOR-1 y/o la traducción del transcrito o transcritos de PHOR-1; y como agentes terapéuticos.

Características moleculares y bioquímicas de PHOR-1

Como se describe adicionalmente en los Ejemplos a continuación, el gen y proteína PHOR-1 se han caracterizado de una diversidad de formas. Por ejemplo, se realizaron análisis de secuencias codificantes de nucleótidos y de aminoácidos para identificar elementos estructurales conservados dentro de la secuencia de PHOR-1, características topológicas, modificaciones post-traduccionales y moléculas potencialmente relacionadas. Se realizaron análisis de RT-PCR, hibridación *in situ* y transferencia de Northern de la expresión de ARNm de PHOR-1 para establecer la variedad de tejidos normales y cancerosos que expresan los diversos mensajes de PHOR-1. Se realizaron análisis de transferencia de Western y separación de células activadas por fluorescencia (FACS) de la expresión proteica de PHOR-1 en células experimentalmente transfectadas para determinar la localización en superficie celular. PHOR-1 tiene un pI de 8,7 y un peso molecular calculado de 35,2 kD.

PHOR-1 es un receptor acoplado a proteína G específico de próstata (GPCR) expresado a altos niveles en tumores de próstata avanzados y localizados. La secuencia de la proteína PHOR-1 pone de manifiesto 7 dominios transmembrana potenciales y tiene homología con los GPCR implicados en la olfacción (Raming y col., 1993, Nature 361: 353; Malnic y col., 1999, Cell 96: 713). Un receptor olfatorio de rata expresado en cerebro conocido como RA1c (Raming y col., 1998, Receptor Channels 6: 141), tiene una secuencia con el mayor grado de homología con PHOR-

1, PHOR-1 tiene una identidad del 59,9% con RA1c en un solapamiento de 299 restos. El probable homólogo humano de RA1c, HPRAJ70 también muestra un grado similar de homología con PHOR-1 (identidad del 59,4% con HPRAJ70 a través de un solapamiento de 298 restos). Se describe que la proteína HPRAJ70 es un GPCR específico de próstata (Patente de Estados Unidos N° 5756309, solicitud PCT WO 96/39435). Se proporcionan alineamientos de las secuencias de aminoácidos de PHOR-1, HPRAJ70 y RA1c en la FIG. 1B.

La homología de PHOR-1 con receptores olfatorios de cerebro condujo a la designación de Homólogo de Próstata del Receptor Olfatorio 1 (PHOR-1). Las proteínas que son miembros de esta familia de receptores presentan un extremo amino-terminal extracelular, tres bucles extracelulares adicionales, tres bucles intracelulares y un extremo carboxilo-terminal intracelular. La segunda región extracelular de PHOR-1 muestra un sitio de N-glicosilación potencial en el resto 90 (NSTT) que sugiere que la proteína puede estar glicosilada. Los GPCR son siete receptores transmembrana que están estimulados por hormonas polipeptídicas o pequeñas moléculas. Sus señales se transmiten por proteínas de unión a nucleótidos de guanina triméricas (proteínas G) con enzimas efectoras o canales iónicos (Simon y col., 1991, Science 252: 802).

Recientemente, también se ha demostrado que los GPCR están relacionados con rutas de señalización mitogénicas de tirosina quinasas (Luttrell y col., 1999, Science 283: 655; Luttrell y col., 1999 Curr Opin Cell Biol 11: 177). Los GPCR están regulados por la fosforilación mediada por GPCR quinasas (GRK), que de por sí se activan indirectamente por los GPCR (Pitcher y col., 1998, Ann. Rev. Biochem. 67: 653). Los GPCR olfatorios transmiten sus señales por activación de la ruta de AMPc mediante adenilato ciclasa y la ruta de la fosfolipasa C por generación de inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) (Breer, 1993, Ciba Found Symp 179: 97; Bruch, 1996, Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 113:451). La generación de AMPc conduce a la activación de proteína quinasa A. El IP3 da como resultado un aumento en el calcio intracelular, mientras que el DAG activa la proteína quinasa C.

Como se analiza en más detalle en los ejemplos a continuación, PHOR-1 presenta características funcionales de un GPCR, según se pone de manifiesto por el comportamiento de las células transfectadas con un vector para expresar PHOR-1. La expresión de PHOR-1 induce la fosforilación de tirosina de una proteína de 55 kDa y la desfosforilación de una proteína de 130 kDa, y también induce la fosforilación de Erk, una proteína quinasa activada por mitógeno. La expresión de PHOR-1 modula la concentración de AMPc citoplasmático según se pone de manifiesto por la acumulación de AMPc en respuesta a suero bovino fetal (FBS) por células que expresan PHOR-1. Además, la expresión de PHOR-1 estimula el crecimiento de colonias en agar blando.

La expresión de PHOR-1 es esencialmente específica de próstata en tejidos humanos adultos normales (FIGS. 5-7) con un nivel de expresión muy bajo detectable por RT-PCR en ovario normal, así como un nivel de expresión muy bajo detectable por transferencia puntual de ARN en tejido cardíaco. En el cáncer de próstata, PHOR-1 se expresa en xenoinjertos en tumores pasados en ratones SCID, así como muestras de tumores biopsiados a partir de pacientes con cáncer de próstata avanzado (FIGS. 5-7). Las comparaciones de la expresión de PHOR-1 en conjuntos relacionados de tejido tumoral frente a tejidos normales adyacentes tomados de pacientes con cáncer de próstata avanzado y pacientes con cáncer de riñón, uterino, cuello uterino, estómago y rectal mostraron un nivel de sobreexpresión muy elevado en la amplia mayoría de pacientes (FIGS. 8-10), indicando un alto nivel de regulación positiva en tejidos tumorales.

Aislamiento de moléculas de ácido nucleico que codifican PHOR-1

Las secuencias de ADNc de PHOR-1 descritas en el presente documento permiten el aislamiento de otros polinucleótidos que codifican un producto o productos génicos de PHOR-1, así como el aislamiento de polinucleótidos que codifican homólogos de productos génicos de PHOR-1, isoformas de corte y empalme alternativo, variantes alélicas y formas mutantes del producto génico de PHOR-1. Se conocen bien diversos procedimientos de clonación molecular que pueden emplearse para aislar ADNc de longitud completa que codifican un gen de PHOR-1 (Véase, por ejemplo, Sambrook, J. y col. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición., Cold Spring Harbor Press, Nueva York, 1989; Current Protocols in Molecular Biology. Ausubel y col., Eds., Wiley and Sons, 1995). Por ejemplo, pueden emplearse convenientemente metodologías de clonación de fago lambda usando sistemas de clonación disponibles en el mercado (por ejemplo, Lambda ZAP Express, Stratagene). Los clones de fagos que contienen ADNc de gen de PHOR-1 pueden identificarse por sondaje con ADNc de PHOR-1 marcado o un fragmento del mismo. Por ejemplo, en una realización, el ADNc de PHOR-1 (FIG. 1A-D; SEC ID N°: 1) o una porción del mismo puede sintetizarse y usarse como sonda para recuperar ADNc de longitud completa y solapantes correspondientes a un gen de PHOR-1. El propio gen de PHOR-1 puede aislarse por exploración de bibliotecas de ADN genómico, bibliotecas de cromosomas artificiales bacterianos (BAC), bibliotecas de cromosomas artificiales de levadura (YAC) y similares, con sondas o cebadores de ADN de PHOR-1.

Moléculas de ADN recombinante y sistemas de huésped-vector

Se describen en el presente documento moléculas de ADN o ARN recombinantes que contienen un polinucleótido de PHOR-1, incluyendo pero sin limitación fagos, plásmidos, fagémidos, cósmidos, YAC, BAC, así como diversos vectores virales y no virales bien conocidos en la técnica, y células transformadas o transfectadas con dichas moléculas de ADN o ARN recombinantes. Como se usa en el presente documento, una molécula de ADN o ARN recombinante es una molécula de ADN o ARN que se ha sometido a manipulación molecular *in vitro*. Se conocen

bien procedimientos para generar dichas moléculas (véase, por ejemplo, Sambrook y col, 1989, anteriormente).

La invención proporciona además un sistema de huésped-vector que comprende una molécula de ADN recombinante que contiene un polinucleótido de PHOR-1 dentro de una célula huésped procariota o eucariota adecuada. Los ejemplos de células huésped eucariotas adecuadas incluyen una célula de levadura, una célula vegetal o una célula animal, tal como una célula de mamífero o una célula de insecto (por ejemplo, una célula susceptible de infectarse por baculovirus, tal como una célula Sf9). Los 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, así como 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 PHOR-1 puede usarse para generar proteínas PHOR-1 o fragmentos de las mismas usando cualquier número de sistemas de huésped-vector usados rutinariamente y ampliamente conocidos en la técnica.

Están disponibles una amplia variedad de sistemas de huésped-vector adecuados para la expresión de proteínas de proteínas PHOR-1 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 sin limitación, pcDNA 3.1 myc-His-tag (Invitrogen) y el vector retroviral pSR α kneo (Muller y col., 1991, MCB 11: 1785). Usando estos vectores de expresión, PHOR-1 puede expresarse preferentemente en varias líneas celulares de cáncer de próstata y distintas de próstata incluyendo, por ejemplo, 293, 293T, rat-1, 3T3, PC-3, LNCaP y TsuPr1. Los sistemas de huésped-vector de la invención son útiles para la producción de una proteína PHOR-1 o fragmento de la misma. Dichos sistemas de huésped-vector pueden emplearse para estudiar las propiedades funcionales de PHOR-1 y mutaciones de PHOR-1.

Las proteínas codificadas por los genes de PHOR-1, o por fragmentos de los mismos, tendrán una diversidad de usos, incluyendo, pero sin limitación, la generación de anticuerpos y en procedimientos para identificar ligandos y otros agentes y constituyentes celulares que se unan a un producto génico de PHOR-1. Los anticuerpos generados contra una proteína PHOR-1 o fragmento de la misma pueden ser útiles en ensayos de diagnóstico y de pronóstico, metodologías de formación de imágenes (incluyendo, particularmente, formación de imágenes de cáncer) y procedimientos terapéuticos en la gestión de cánceres humanos caracterizados por la expresión de una proteína PHOR-1, incluyendo, pero sin limitación, cáncer de próstata. Se contemplan diversos ensayos inmunológicos útiles para la detección de proteínas PHOR-1, incluyendo, pero sin limitación, diversos tipos de radioinmunoensayos, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), ensayos inmunofluorescentes ligados a enzimas (ELIFA), procedimientos inmunocitoquímicos y similares. Dichos anticuerpos pueden marcarse y usarse como reactivos de formación de imágenes inmunológicas capaces de detectar células de próstata (por ejemplo, en procedimientos de formación de imágenes radioescintigráficas). Las proteínas PHOR-1 también pueden ser particularmente útiles en la generación de vacunas contra el cáncer, como se describe adicionalmente a continuación.

Proteínas PHOR-1

Otras descritas en el presente documento son proteínas PHOR-1 y fragmentos polipeptídicos de las mismas. Las proteínas PHOR-1 incluyen las identificadas específicamente en el presente documento, así como variantes alélicas, variantes de sustitución conservativa y homólogos, en la medida en que dichas variantes y homólogos puedan aislarse/generarse y caracterizarse sin una experimentación innecesaria siguiendo los procedimientos resumidos a continuación. También se incluyen proteínas de fusión que combinan partes de diferentes proteínas PHOR-1 o fragmentos de las mismas, así como proteínas de fusión de una proteína PHOR-1 y un polipéptido heterólogo. Dichas proteínas PHOR-1 se denominarán en su conjunto proteínas PHOR-1 o PHOR-1. Como se usa en el presente documento, la expresión "polipéptido de PHOR-1" se refiere a un fragmento polipeptídico o una proteína PHOR-1 de al menos 10 aminoácidos, preferentemente de al menos 15 aminoácidos.

Un ejemplo específico de una proteína PHOR-1 comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de PHOR-1 humana como se muestra en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2), del número de resto de aminoácido 1 a aproximadamente el número de resto de aminoácido 317, como se muestra en la misma. Otro ejemplo específico de una proteína PHOR-1 comprende un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de PHOR-1 humana como se muestra en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2), de aproximadamente el número de resto de aminoácido 86 a aproximadamente el número de resto de aminoácido 310, como se muestra en la misma. Un ejemplo específico de un fragmento de PHOR-1 comprende un péptido seleccionado del grupo que comprende los aminoácidos 1-14 de la secuencia de la proteína PHOR-1 mostrada en la FIG. 1A-D (MVDPNGNESSATYF; SEC ID N°: 8), los aminoácidos 262-274 de la secuencia de la proteína PHOR-1 mostrada en la FIG. 1A-D (VHRFSKRRDSPLP; SEC ID N°: 9) y las porciones extracelulares de PHOR-1 (aminoácidos 1-28, 86-99, 159-202 y 262-272 de la SEC ID N°: 2). Otros ejemplos específicos incluyen uno o ambos dominios transmembrana identificados en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2).

En general, las variantes alélicas de origen natural de PHOR-1 humana compartirán un alto grado de identidad y homología estructural (por ejemplo, una identidad del 90% o más). Típicamente, las variantes alélicas de las proteínas PHOR-1 contendrán sustituciones de aminoácidos conservativas dentro de las secuencias de PHOR-1 descritas en el presente documento o contendrán una sustitución de un aminoácido de una posición correspondiente en un homólogo de PHOR-1. Una clase de variantes alélicas de PHOR-1 serán proteínas que comparten un alto

grado de homología con al menos una pequeña región de una secuencia de aminoácidos de PHOR-1 particular, pero contendrán además una desviación radical de la secuencia, tal como una sustitución no conservativa, inserción de truncamiento o desplazamiento de fase de lectura.

Las sustituciones de aminoácidos conservativas pueden realizarse frecuentemente en una proteína sin alterar la conformación o la función de la proteína. Dichos cambios incluyen sustituir cualquiera de isoleucina (I), valina (V) y leucina (L) por otro cualquiera de estos aminoácidos hidrófobos; ácido aspártico (D) en lugar de ácido glutámico (E) y viceversa; glutamina (Q) en lugar de asparagina (N) y viceversa; y serina (S) en lugar de treonina (T) y viceversa. Otras sustituciones también pueden considerarse conservativas dependiendo del entorno del aminoácido particular y de su papel en la estructura tridimensional de la proteína. Por ejemplo, la glicina (G) y la alanina (A) pueden ser frecuentemente intercambiables, como pueden serlo la alanina (A) y la valina (V). La metionina (M), que es relativamente hidrófoba, puede intercambiarse frecuentemente con leucina e isoleucina, y a veces con valina. La lisina (K) y arginina (R) son frecuentemente intercambiables en localizaciones en las que la característica significativa del resto de aminoácido es su carga y los pK diferentes de estos dos restos de aminoácidos no son significativos. Todavía otros cambios pueden considerarse "conservativos" en entornos particulares.

Las proteínas PHOR-1, incluyendo variantes, comprenden al menos un epítipo en común con una proteína PHOR-1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2), tal como un anticuerpo que se une específicamente a una proteína PHOR-1 o una variante que también se unirá específicamente a la proteína PHOR-1 que tiene la secuencia de aminoácidos de la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2). Una clase de variantes de proteína PHOR-1 comparte una identidad del 90% o más con la secuencia de aminoácidos de la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2). Una clase más específica de variantes de proteína PHOR-1 comprende un dominio extracelular según se identifica en la FIG. 4. Las variantes de proteína PHOR-1 preferidas son capaces de presentar una o más de las funciones GPCR descritas en el presente documento incluyendo, por ejemplo, la capacidad para modular la concentración de AMPc citosólico y la fosforilación de tirosina, y la capacidad para estimular el crecimiento de colonias.

Las proteínas PHOR-1 pueden incorporarse en muchas formas, preferentemente en forma aislada. Como se usa en el presente documento, se dice que una proteína está "aislada" cuando se emplean procedimientos físicos, mecánicos o químicos para retirar la proteína PHOR-1 de los constituyentes celulares que están normalmente asociados con la proteína. Un experto en la materia puede emplear fácilmente procedimientos de purificación convencionales para obtener una proteína PHOR-1 aislada. Una molécula proteica de PHOR-1 purificada estará sustancialmente libre de otras proteínas o moléculas que alteren la unión de PHOR-1 al anticuerpo u otro ligando. La naturaleza y grado de aislamiento y purificación dependerán del uso deseado. Las realizaciones de una proteína PHOR-1 incluyen una proteína PHOR-1 purificada y una proteína PHOR-1 soluble funcional. En una forma, dichas proteínas PHOR-1 solubles funcionales o fragmentos de las mismas conservan la capacidad para unirse a un anticuerpo u otro ligando.

Los polipéptidos de PHOR-1 que comprenden fragmentos biológicamente activos de la secuencia de aminoácidos de PHOR-1, tales como un polipéptido que corresponde a parte de las secuencias de aminoácidos de PHOR-1, como se muestran en las FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2). Dichos polipéptidos presentan propiedades de la proteína PHOR-1, tales como la capacidad para suscitar la generación de anticuerpos que se unan específicamente a un epítipo asociado con la proteína PHOR-1.

Se conocen una amplia diversidad de variantes aceptadas en la técnica de proteínas PHOR-1, tales como polipéptidos que tienen inserciones, deleciones y sustituciones de aminoácidos. Pueden generarse variantes de PHOR-1 usando procedimientos conocidos en la técnica tales como mutagénesis dirigida, barrido mediante alanina y mutagénesis por PCR. La mutagénesis dirigida [Carter y col., Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zoller y col., Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)], la mutagénesis con casete [Wells y col., Gene, 34: 315 (1985)], la mutagénesis por selección de restricción [Wells y col., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)] u otras técnicas conocidas pueden realizarse sobre el ADN clonado para producir el ADN de variante de PHOR-1. El análisis de aminoácidos por barrido también puede emplearse para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de barrido preferidos están aminoácidos neutros relativamente pequeños. Dichos aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es típicamente un aminoácido de barrido preferido dentro de este grupo debido a que elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de cadena principal de la variante. La alanina también se prefiere típicamente porque es el aminoácido más común. Además, se encuentra frecuentemente en posiciones tanto enterradas como expuestas [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976)]. Si la sustitución de alanina no produce cantidades adecuadas de variante, puede usarse un aminoácido isostérico.

Los polipéptidos que contienen una secuencia de menos de 317 aminoácidos de la proteína PHOR-1 mostrada en la FIG. 1A-D (la SEC ID N°: 2 se ha analizado anteriormente). Por ejemplo, polipéptidos que consisten en de aproximadamente el aminoácido 1 a aproximadamente el aminoácido 10 de la proteína PHOR-1 mostrada en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2), polipéptidos que consisten en de aproximadamente el aminoácido 20 a aproximadamente el aminoácido 30 de la proteína PHOR-1 mostrada en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2), polipéptidos que consisten en de aproximadamente el aminoácido 30 a aproximadamente el aminoácido 40 de la proteína PHOR-1 mostrada en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2), polipéptidos que consisten en de aproximadamente el aminoácido 40 a aproximadamente el aminoácido 50 de la proteína PHOR-1 mostrada en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2), polipéptidos que consisten en de

aproximadamente el aminoácido 50 a aproximadamente el aminoácido 60 de la proteína PHOR-1 mostrada en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2), polipéptidos que consisten en de aproximadamente el aminoácido 60 a aproximadamente el aminoácido 70 de la proteína PHOR-1 mostrada en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2), polipéptidos que consisten en de aproximadamente el aminoácido 70 a aproximadamente el aminoácido 80 de la proteína PHOR-1 mostrada en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2), polipéptidos que consisten en de aproximadamente el aminoácido 80 a aproximadamente el aminoácido 90 de la proteína PHOR-1 mostrada en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2) y polipéptidos que consisten en de aproximadamente el aminoácido 90 a aproximadamente el aminoácido 100 de la proteína PHOR-1 mostrada en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2), etc. Siguiendo este esquema, se describen polipéptidos que consisten en porciones de la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 100-317 de la proteína PHOR-1. También se describen polipéptidos que consisten en porciones más grandes de la proteína PHOR-1. Por ejemplo, pueden generarse por una diversidad de procedimientos bien conocidos en la técnica polipéptidos que consisten en de aproximadamente el aminoácido 1 (o 20 ó 30 ó 40, etc.) a aproximadamente el aminoácido 20 (o 30 ó 40 ó 50, etc.) de la proteína PHOR-1 mostrada en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2).

Los polipéptidos de PHOR-1 que contienen los restos de aminoácidos de uno o más de los motivos biológicos contenidos dentro de la secuencia polipeptídica de PHOR-1 se muestran en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2). Los polipéptidos típicos pueden contener una o más de la regiones de PHOR-1 que presentan homología con HPRAJ70 y/o RA1c. Los polipéptidos típicos de la invención pueden contener uno o más de los sitios de N-glicosilación de PHOR-1, tales como NESS (SEC ID N°: 10) en los restos 7-10 (numeración del primer resto de aminoácido mostrado en la SEC ID N°: 2), NLTl (SEC ID N°: 11) en los restos 44-47 y/o NSTT en los restos 90-93 (SEC ID N°: 12). Los polipéptidos típicos de la invención pueden contener uno o más de los sitios de fosforilación de AMPc de PHOR-1 tales como RRDS en los restos 268-271 (SEC ID N°: 13). Los polipéptidos típicos pueden contener uno o más de los sitios de fosforilación de proteína quinasa C de PHOR-1 tales como SKR en los restos 266-268. Los polipéptidos típicos de la invención pueden contener uno o más de los sitios de fosforilación de caseína quinasa II de PHOR-1 tales como SLHE en los restos 56-59 (SEC ID N°: 14), SGID en los restos 69-72 (SEC ID N°: 15) y/o SGME en los restos 110-113 (SEC ID N°: 16). Los polipéptidos típicos de la invención pueden contener uno o más de los sitios de N-miristoilación tales como GNESSA en los restos 6-11 (SEC ID N°: 17), GLEEAQ en los restos 21-26 (SEC ID N°: 18), GMESTV en los restos 111-116 (SEC ID N°: 19) y/o GTCVSH en los restos 240-245 (SEC ID N°: 20). Los polipéptidos típicos de la invención pueden contener uno o más de las secuencias distintivas de GPCR, tales como los restos de aminoácidos 112-128 de la SEC ID N°: 2 y/o una o más de las secuencias distintivas de receptor olfatorio, tales como los restos de aminoácidos 61-82 y/o 239-254 de la SEC ID N°: 2. Los polipéptidos que contienen combinaciones de los diferentes motivos analizados anteriormente, siendo ejemplos preferibles los que no contienen inserciones, deleciones o sustituciones dentro de los motivos o las secuencias intermedias de estos polipéptidos.

Pueden generarse polipéptidos de PHOR-1 usando tecnología de síntesis de péptidos convencional o usando procedimientos de escisión química bien conocidos en la técnica basándose en las secuencias de aminoácidos de las proteínas PHOR-1 humanas desveladas en el presente documento. Como alternativa, pueden usarse procedimientos recombinantes para generar moléculas de ácido nucleico que codifiquen un fragmento polipeptídico de una proteína de PHOR-1. A este respecto, las moléculas de ácido nucleico que codifican PHOR-1 descritas en el presente documento proporcionan medios para generar fragmentos definidos de proteínas PHOR-1. Los polipéptidos de PHOR-1 son particularmente útiles en la generación y caracterización de anticuerpos específicos de dominio (por ejemplo, anticuerpos que reconocen un epítipo extracelular o intracelular de una proteína PHOR-1), en la identificación de agentes o factores celulares que se unen a PHOR-1 o un dominio estructural particular del mismo, y en diversos contextos terapéuticos, incluyendo pero sin limitación vacunas contra el cáncer. Los polipéptidos de PHOR-1 que contienen estructuras particularmente interesantes pueden predecirse y/o identificarse usando diversos procedimientos analíticos bien conocidos en la técnicas, incluyendo, por ejemplo, los procedimientos de análisis de Chou-Fasman, Garnier-Robson, Kyte-Doolittle, Eisenberg, Karplus-Schultz o Jameson-Wolf, o basándose en la inmunogenicidad. Los fragmentos que contienen dichas estructuras son particularmente útiles en la generación de anticuerpos anti-PHOR-1 específicos de subunidad o en la identificación de factores celulares que se unen a PHOR-1.

En los ejemplos a continuación, una forma secretada de PHOR-1 puede expresarse convenientemente en células 293T transfectadas con un vector de expresión dirigido por CMV que codifica PHOR-1 con un marcador MYC y 6XHis C-terminal (pcDNA3.1/mycHis, Invitrogen). El PHOR-1 marcado con HIS en el medio de cultivo puede purificarse usando una columna de níquel y técnicas convencionales. Como alternativa, puede usarse un sistema de marcador de AP. Se describen en los ejemplos a continuación diversas construcciones para la expresión de PHOR-1.

Son posibles modificaciones de PHOR-1 tales como modificaciones covalentes. Un tipo de modificación covalente incluye hacer reaccionar restos de aminoácidos diana de un polipéptido de PHOR-1 con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los restos N- o C- terminales del PHOR-1. Otro tipo de modificación covalente del polipéptido de PHOR-1 comprende alterar el patrón de glicosilación nativo del polipéptido. La "alteración del patrón de glicosilación nativo" pretende significar para los fines del presente documento deleciónar uno o más restos carbohidrato que se encuentran en la secuencia nativa de PHOR-1 (por eliminación del sitio de glicosilación subyacente o por deleción de la glicosilación por medios químicos y/o enzimáticos) y/o añadir uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en la secuencia nativa de PHOR-1.

Además, la expresión incluye cambios cualitativos en la glicosilación de las proteínas nativas, que implican un cambio en la naturaleza y las proporciones de los diversos restos carbohidrato presentes. Otro tipo de modificación covalente de PHOR-1 comprende unir el polipéptido de PHOR-1 a uno de una diversidad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la forma expuesta en las Patentes de Estados Unidos N° 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337.

El PHOR-1 también puede modificarse de un modo para formar una molécula quimérica que comprende PHOR-1 fusionado a otro polipéptido o secuencia de aminoácidos heteróloga. Dicha molécula quimérica comprende una fusión del PHOR-1 con un marcador epitópico de polihistidina que proporciona un epítipo al que puede unirse selectivamente níquel inmovilizado. El marcador epitópico se pone generalmente en el extremo amino- o carboxilo-terminal del PHOR-1. La molécula quimérica puede comprender una fusión del PHOR-1 con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (también denominada "inmunoadhesina"), una fusión de este tipo podría ser con la región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones de Ig incluyen preferentemente la sustitución de una forma soluble (dominio transmembrana deletado o inactivado) de un polipéptido de PHOR-1 en lugar de al menos una región variable dentro de una molécula de Ig. La fusión de inmunoglobulina incluye la bisagra, CH2 y CH3 o las regiones de bisagra, CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones con inmunoglobulina, véase también la Patente de Estados Unidos N° 5.428.130 expedida el 27 de junio de 1995.

Anticuerpos contra PHOR-1

También se describen en el presente documento anticuerpos que se unen a proteínas y polipéptidos de PHOR-1. Los anticuerpos más preferidos se unirán selectivamente a una proteína PHOR-1 y no se unirán (o se unirán débilmente) a proteínas y polipéptidos distintos de PHOR-1. Los anticuerpos anti-PHOR-1 que se contemplan particularmente incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales, así como fragmentos que contienen el dominio de unión a antígeno y/o una o más regiones determinantes de complementariedad de estos anticuerpos. Como se usa en el presente documento, un fragmento de anticuerpo se define como al menos una porción 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 aplicaciones, puede ser deseable generar anticuerpos que reaccionen específicamente con una proteína PHOR-1 particular y/o un epítipo dentro de un dominio estructural particular. Por ejemplo, los anticuerpos preferidos útiles para la terapia del cáncer y para fines de formación de imágenes de diagnóstico son los que reaccionan con un epítipo en una región extracelular de la proteína PHOR-1 como se expresa en células cancerosas. Dichos anticuerpos pueden generarse usando las proteínas PHOR-1 descritas en el presente documento, o usando péptidos derivados de dominios extracelulares esperados de las mismas, como un inmunógeno. A este respecto, con referencia a la secuencia de la proteína PHOR-1 mostrada en la FIG. 1, pueden seleccionarse regiones en la secuencia amino-terminal respecto al dominio transmembrana y usarse para diseñar inmunógenos apropiados y reactivos de exploración para generar y seleccionar anticuerpos contra PHOR-1 específicos de dominio extracelular.

Los anticuerpos contra PHOR-1 pueden ser particularmente útiles en estrategias terapéuticas para el cáncer de próstata, ensayos de diagnóstico y pronóstico, y metodologías de formación de imágenes. De forma similar, dichos anticuerpos pueden ser útiles en el tratamiento, diagnóstico y/o pronóstico de otros cánceres, en la medida en que PHOR-1 se exprese o se sobreexpresa también en otros tipos de cáncer. Existen diversos ensayos inmunológicos útiles para la detección y cuantificación de PHOR-1 y proteínas y polipéptidos de PHOR-1 mutantes. Dichos ensayos comprenden generalmente uno o más anticuerpos contra PHOR-1 capaces de reconocer y unirse a un PHOR-1 o proteína PHOR-1 mutante, según sea apropiado, y pueden realizarse dentro de diversos formatos de ensayo inmunológicos bien conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, diversos tipos de radioinmunoensayos, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), ensayos inmunofluorescentes ligados a enzimas (ELIFA) y similares. Además, también son posibles procedimientos de formación de imágenes inmunológicas capaces de detectar el cáncer de próstata incluyendo, pero sin limitación, procedimientos de formación de imágenes radioescintigráficas usando anticuerpos contra PHOR-1 marcados. Dichos ensayos pueden usarse clínicamente en la detección, control y pronóstico del cáncer de próstata, particularmente cáncer de próstata avanzado.

También pueden usarse anticuerpos contra PHOR-1 en los procedimientos para purificar PHOR-1 y proteínas y polipéptidos de PHOR-1 mutantes, y para aislar homólogos de PHOR-1 y moléculas relacionadas. Por ejemplo, el procedimiento de purificación de una proteína PHOR-1 comprende incubar un anticuerpo contra PHOR-1 que se ha acoplado a una matriz sólida, con un lisado u otra solución que contiene PHOR-1 en condiciones que permitan al anticuerpo contra PHOR-1 unirse a PHOR-1; lavar la matriz sólida para eliminar impurezas; y eluir el PHOR-1 del anticuerpo acoplado. Otros usos de los anticuerpos contra PHOR-1 de la invención incluyen generar anticuerpos anti-idiotípicos que mimeticen la proteína PHOR-1.

También pueden usarse terapéuticamente anticuerpos contra PHOR-1, por ejemplo, por modulación o inhibición de la actividad biológica de una proteína PHOR-1 o fijación como diana y destrucción de células cancerosas que expresen una proteína PHOR-1. La terapia con anticuerpos del cáncer de próstata y otros cánceres se describe más específicamente en una subsección separada a continuación.

Se conocen bien en la técnica diversos procedimientos para la preparación de anticuerpos. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos por inmunización de un huésped de mamífero adecuado usando una proteína, péptido o fragmento de PHOR-1 en forma aislada o inmunoconjugada (Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press, Eds., Harlow y Lane (1988); Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press, NY (1989)). Los ejemplos de inmunógenos proteicos incluyen PHOR-1 recombinante (expresada en un sistema de baculovirus, sistema de mamífero, etc.), dominio extracelular de PHOR-1, PHOR-1 marcado con AP, etc. Además, también pueden usarse proteínas de fusión de PHOR-1, tales como una fusión de PHOR-1 con GST, proteína de unión a maltosa (MBP), proteína verde fluorescente (GFP), HisMax-TOPO o MycHis (véanse los Ejemplos a continuación).

Puede producirse una proteína de fusión con AGST que comprende toda o la mayoría de la secuencia de aminoácidos de la fase de lectura abierta de la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2) y usarse como un inmunógeno para generar anticuerpos apropiados. También pueden usarse para inmunizaciones células que expresen o sobreexpresen PHOR-1. De forma similar, puede usarse cualquier célula modificada por ingeniería genética para que exprese PHOR-1. Dichas estrategias pueden dar como resultado la producción de anticuerpos monoclonales con capacidades mejoradas para reconocer el PHOR-1 endógeno. Otro inmunógeno útil comprende péptidos de PHOR-1 unidos a la membrana plasmática de eritrocitos de oveja.

La secuencia de aminoácidos de PHOR-1 como se muestra en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2) puede usarse para seleccionar regiones específicas de la proteína PHOR-1 para generar anticuerpos. Por ejemplo, pueden usarse análisis de hidrofobicidad e hidrofiliidad de la secuencia de aminoácidos de PHOR-1 para identificar regiones hidrófilas en la estructura de PHOR-1. Las regiones de la proteína PHOR-1 que muestran una estructura inmunogénica, así como 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. Pueden seleccionarse péptidos de PHOR-1 que se espera se unan a HLA-A2 para la generación de anticuerpos. Como se analiza en los ejemplos a continuación, se ha demostrado la inmunogenicidad con los aminoácidos 1-14 (MVDPNGNESSATYF; SEC ID N°: 8), los aminoácidos 262-274 (VHRFSKRKRDSP; SEC ID N°: 9) y los aminoácidos 86-310 de la secuencia de la proteína PHOR-1 (SEC ID N°: 2), que se usaron para generar anticuerpos policlonales y monoclonales usando conejos y ratones, respectivamente. Esta respuesta de linfocitos B (producción de anticuerpo) es el resultado de una respuesta de linfocitos T inicial generada por las porciones inmunogénicas de PHOR-1.

Se conocen bien en la técnica procedimientos para preparar una proteína o polipéptido para su uso como un inmunógeno y para preparar conjugados inmunogénicos de una proteína con un vehículo tal como BSA, KLH u otras proteínas transportadoras. 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 los suministrados por Pierce Chemical Co., Rockford, IL. La administración de un inmunógeno de PHOR-1 se realiza generalmente por inyección a lo largo de un período adecuado y con el uso de un adyuvante adecuado, como se entiende en general en la técnica. Durante el programa de inmunización, pueden tomarse los títulos de anticuerpos para determinar la conveniencia de la formación de anticuerpos.

Se prefieren anticuerpos monoclonales contra PHOR-1 y pueden producirse por diversos medios bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse líneas celulares inmortalizadas que secreten un anticuerpo monoclonal deseado usando la tecnología de hibridoma convencional de Kohler y Milstein, o modificaciones que immortalicen linfocitos B productores, como se conocen en general. Las líneas de celulares inmortalizadas que secretan los anticuerpos deseados se exploran mediante un inmunoensayo en el que el antígeno es la proteína PHOR-1 o un fragmento de PHOR-1. Cuando el cultivo celular inmortalizado apropiado que secreta el anticuerpo deseado se identifica, las células pueden expandirse y los anticuerpos producirse a partir de cultivos *in vitro* o de líquido ascítico.

Los anticuerpos o fragmentos también pueden producirse, usando la tecnología actual, por medios recombinantes. También pueden producirse regiones que se unen específicamente a las regiones deseadas de la proteína PHOR-1 en el contexto de anticuerpos con CDR injertadas o quiméricos de origen de múltiples especies. También pueden producirse anticuerpos contra PHOR-1 humanos o humanizados y se prefieren para su uso en contextos terapéuticos. Se conocen bien procedimientos para humanizar anticuerpos murinos y otros no humanos por sustitución de una o más de las CDR de anticuerpos no humanos por secuencias de anticuerpos humanos correspondientes (véase, por ejemplo, Jones y col, 1986, Nature 321: 522-525; Riechmann y col, 1988, Nature 332: 323-327; Verhoeyen y col, 1988, Science 239: 1534-1536). Véase también, Carter y col, 1993, Proc. Nat'l Acad Sci. USA. 89: 4285 y Sims y col, 1993, J. Immunol. 151:2296. Los procedimientos para producir anticuerpos monoclonales totalmente humanos incluyen tecnologías de presentación en fago y animales transgénicos (para una revisión, véase Vaughan y col, 1998, Nature Biotechnology 16: 535-539).

Pueden generarse anticuerpos monoclonales contra PHOR-1 totalmente humanos usando tecnologías de clonación que emplean grandes bibliotecas combinatorias de genes de Ig humana (es decir, presentación 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, págs. 45-64 (1993); Burton y Barbas, Human Antibodies from combinatorial libraries. Id., págs. 65-82). También pueden producirse anticuerpos monoclonales contra PHOR-1 totalmente humanos usando ratones transgénicos modificados por ingeniería genética para contener loci de genes de inmunoglobulina humana como se

describen en la Solicitud de Patente PCT W098/24893, Kucherlapati y Jakobovits y col, publicada el 3 de diciembre de 1997 (véase también, Jakobovits, 1998, Exp. Opin. Invest. Drugs. 7(4): 607-614). Este procedimiento evita la manipulación *in vitro* necesaria con la tecnología de presentación en fago y produce eficazmente anticuerpos humanos auténticos de gran afinidad.

- 5 La reactividad de anticuerpos contra PHOR-1 con una proteína PHOR-1 puede establecerse por varios medios bien conocidos, incluyendo análisis de transferencia de Western, inmunoprecipitación, ELISA y FACS usando, según sea apropiado, proteínas PHOR-1, péptidos, células que expresan PHOR-1 o extractos de las mismas.

- Un anticuerpo contra PHOR-1 o fragmento del mismo puede marcarse con un marcador detectable o conjugarse con una segunda molécula, tal como una citotoxina u otro agente terapéutico, y usarse para dirigir la segunda molécula a una célula positiva para PHOR-1 (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). Los ejemplos de agentes citotóxicos incluyen, pero sin limitación, ricina, cadena A de ricina, doxorubicina, daunorubicina, taxol, bromuro de etidio, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, dihidroxi antracino diona, actinomicina, toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas* (PE) A, PE40, abrina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, gelonina, mitogelina, retstrictocina, fenomicina, enomicina, curicina, crotina, calicheamicina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis* y glucocorticoides y otros agentes quimioterápicos, así como radioisótopos tales como ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re. Los marcadores detectables adecuados incluyen, pero sin limitación, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un quelante de metales o una enzima. Los anticuerpos también pueden conjugarse con una enzima activadora de profármaco anticáncer capaz de convertir el profármaco en su forma activa. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 4.975.287.
- 10
- 15
- 20

- Además, pueden generarse anticuerpos biespecíficos específicos para dos o más epítomos de PHOR-1 usando procedimientos conocidos en general en la técnica. Además, las funciones efectoras de anticuerpos pueden modificarse para aumentar el efecto terapéutico de anticuerpos contra PHOR-1 en células cancerosas. Por ejemplo, pueden introducirse por ingeniería genética restos de cisteína en la región Fc, permitiendo la formación de enlaces disulfuro intercatenarios y la generación de homodímeros que pueden tener capacidades aumentadas de internalización, ADCC y/o destrucción de células mediada por el complemento (véase, por ejemplo, Caron y col., 1992, J. Exp. Med 176: 1191-1195; Shopes, 1992, J. Immunol. 148: 2918-2922). También pueden generarse anticuerpos homodiméricos mediante procedimientos de entrecruzamiento conocidos en la técnica (por ejemplo, Wolff y col., Cancer Res. 53: 2560-2565).
- 25
- 30

Animales transgénicos para PHOR-1

- Los ácidos nucleicos que codifican PHOR-1 o sus formas modificadas también pueden usarse para generar animales transgénicos o animales "*knock out*" que, a su vez, son útiles en el desarrollo y la exploración de reactivos terapéuticamente útiles. Un animal transgénico (por ejemplo, un ratón o rata) es un animal que tiene células que contienen un transgén, cuyo transgén se introdujo en el animal o un antepasado del animal en una fase prenatal, por ejemplo, embrionaria. Un transgén es un ADN que se integra en el genoma de una célula a partir de la cual se desarrolla un animal transgénico. En una realización, puede usarse ADNc que codifica PHOR-1 para clonar ADN genómico que codifica PHOR-1 de acuerdo con técnicas establecidas, y las secuencias genómicas usarse para generar animales transgénicos que contienen células que expresan ADN que codifica PHOR-1.
- 35

- Los procedimientos para generar animales transgénicos, particularmente animales tales como ratones o ratas, se han vuelto convencionales en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nº 4.736.866 y 4.870.009. Típicamente, células particulares se fijarían como diana para la incorporación del transgén de PHOR-1 con potenciadores específicos de tejido. Los animales transgénicos que incluyen una copia de un transgén que codifica PHOR-1 introducido en la línea germinal del animal en una fase embrionaria pueden usarse para examinar el efecto de una expresión aumentada de ADN que codifica PHOR-1. Dichos animales pueden usarse como animales de ensayo para reactivos que se crea que confieren protección frente a, por ejemplo, afecciones patológicas asociadas con su sobreexpresión. Un animal tratado con el reactivo y una incidencia reducida de la afección patológica, en comparación con animales no tratados que portan el transgén, indicaría una intervención terapéutica potencial para la afección patológica.
- 40
- 45

- Como alternativa, pueden usarse homólogos no humanos de PHOR-1 para construir un animal "*knock out*" para PHOR-1 que tenga un gen defectuoso o alterado que codifique PHOR-1 como resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica PHOR-1 y un ADN genómico alterado que codifica PHOR-1 introducido en una célula embrionaria del animal. Por ejemplo, puede usarse un ADNc que codifica PHOR-1 para clonar ADN genómico que codifica PHOR-1 de acuerdo con técnicas establecidas. Una porción del ADN genómico que codifica PHOR-1 puede delecionarse o sustituirse con otro gen, tal como un gen que codifica un marcador de selección que puede usarse para controlar la integración.
- 50
- 55

Típicamente, se incluyen varias kilobases de ADN flanqueante sin alteraciones (tanto en los extremos 5' como 3') en el vector (véase, por ejemplo, Thomas y Capecchi, 1987, Cell 51: 503 para una descripción de vectores de recombinación homóloga). El vector se introduce en una línea celular madre embrionaria (por ejemplo, por

electroporación) y las células en las que el ADN introducido se ha recombinado homológamente con el ADN endógeno se seleccionan (véase, por ejemplo, Li y col., 1992, Cell 69: 915). Las células seleccionadas se inyectan después en un blastocisto de un animal (por ejemplo, un ratón o rata) para formar quimeras de agregación (véase, por ejemplo, Bradley, en Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed., IRL, Oxford, 1987, págs. 113-152).

Un embrión quimérico puede implantarse después en un animal de acogida hembra pseudogestante adecuado y el embrión llevarse a término para crear un animal "knock out". La progenie que alberga el ADN recombinado de forma homóloga en sus células germinales puede identificarse por técnicas convencionales y usarse para reproducir animales en los que todas las células del animal contengan el ADN recombinado de forma homóloga. Los animales *knock out* pueden caracterizarse, por ejemplo, por su capacidad para defenderse frente a ciertas afecciones patológicas y por su desarrollo de afecciones patológicas debido a la ausencia del polipéptido de PHOR-1.

Procedimientos para la detección de PHOR-1

Se describen en el presente documento procedimientos para detectar polinucleótidos de PHOR-1 y proteínas PHOR-1 y variantes de las mismas, así como procedimientos para identificar una célula que exprese PHOR-1. El patrón de expresión altamente restringido a tejido de PHOR-1 sugiere que esta molécula puede servir como marcador de diagnóstico para enfermedad metastásica. En este contexto, el estado de productos génicos de PHOR-1 puede proporcionar información útil para predecir una diversidad de factores incluyendo la susceptibilidad a una enfermedad en fase avanzada, la velocidad de progresión y/o la agresividad del tumor. Como se analiza en detalle a continuación, el estado de productos génicos de PHOR-1 en muestras de pacientes puede analizarse mediante una diversidad de protocolos que son bien conocidos en la técnica, incluyendo análisis inmunohistoquímico, la diversidad de técnicas de transferencia de Northern incluyendo hibridación *in situ*, análisis por RT-PCR (por ejemplo, en muestras microdisecadas por captura con láser), análisis de transferencia de Western y análisis de matrices de tejidos.

Más particularmente, se describen ensayos para la detección de polinucleótidos de PHOR-1 en una muestra biológica, tal como tejido de próstata, tejido de riñón, tejido uterino, espécimen de cuello uterino, tejido de estómago, tejido rectal, tejido óseo, tejido linfático y otros tejidos, orina, semen, sangre o suero, preparaciones celulares y similares. Los polinucleótidos de PHOR-1 detectables incluyen, por ejemplo, un gen de PHOR-1 o fragmentos del mismo, ARNm de PHOR-1, ARNm de PHOR-1 de variantes de corte y empalme alternativas y moléculas de ADN o ARN recombinantes que contienen un polinucleótido de PHOR-1. Se conocen bien en la técnica varios procedimientos para amplificar y/o detectar la presencia de polinucleótidos de PHOR-1.

En un ejemplo, se describe un procedimiento para detectar un ARNm de PHOR-1 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 de PHOR-1 como cebadores con sentido y antisentido para amplificar ADNc de PHOR-1 en la misma; y detectar la presencia del ADNc de PHOR-1 amplificado. Opcionalmente, puede determinarse la secuencia del ADNc de PHOR-1 amplificado. En otro ejemplo, se describe un procedimiento de detección de un gen de PHOR-1 en una muestra biológica que comprende aislar primero ADN genómico a partir de la muestra; amplificar el ADN genómico aislado usando polinucleótidos de PHOR-1 como cebadores con sentido y antisentido para amplificar el gen de PHOR-1 en la misma; y detectar la presencia del gen de PHOR-1 amplificado. Cualquier cantidad de combinaciones de sondas con sentido y antisentido apropiadas pueden diseñarse a partir de las secuencias de nucleótidos proporcionadas para el PHOR-1 (FIG. 1A-D; SEC ID N°: 1) y usarse con este fin.

Se describen ensayos para detectar la presencia de una proteína PHOR-1 en un tejido de otra muestra biológica tal como suero, hueso, próstata y otros tejidos, orina, preparaciones celulares y similares, así como ensayos citológicos para la detección de células que expresen PHOR-1. También se conocen bien procedimientos para detectar una proteína PHOR-1 e incluyen, por ejemplo, inmunoprecipitación, análisis inmunohistoquímico, análisis de transferencia de Western, ensayos de unión molecular y celular, ELISA, ELIFA y similares. Por ejemplo, un procedimiento de detección de la presencia de una proteína PHOR-1 en una muestra biológica implica poner en contacto primero la muestra con un anticuerpo contra PHOR-1, un fragmento reactivo con PHOR-1 del mismo, o una proteína recombinante que contiene una región de unión a antígeno de un anticuerpo contra PHOR-1; y después detectar la unión de la proteína PHOR-1 en la muestra al mismo.

También se describen en el presente documento procedimientos para identificar una célula que exprese PHOR-1. Un ensayo para identificar una célula que exprese un gen de PHOR-1 comprende detectar la presencia de ARNm de PHOR-1 en la célula como se describe. Se conocen bien procedimientos para la detección de ARNm particulares en células e incluyen, por ejemplo, ensayos de hibridación usando sondas de ADN complementarias (tales como hibridación *in situ* usando ribosondas de PHOR-1 marcadas, transferencia de Northern y técnicas relacionadas) y diversos ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (tales como RT-PCR usando cebadores complementarios específicos para PHOR-1, y otros procedimientos de detección de tipo amplificación, tales como, por ejemplo, ADN ramificado, SISBA, TMA y similares). Como alternativa, un ensayo para identificar una célula que exprese un gen de PHOR-1 comprende detectar la presencia de proteína PHOR-1 en la célula o secretada por la célula. Se conocen bien en la técnica diversos procedimientos para la detección de proteínas y pueden emplearse para la detección de proteínas PHOR-1 y células que expresen PHOR-1.

El análisis de expresión de PHOR-1 también puede ser útil como herramienta para identificar y evaluar agentes que modulen la expresión del gen de PHOR-1. Por ejemplo, la expresión de PHOR-1 está restringida a próstata normal, así como a cánceres de la próstata, riñón, útero, cuello uterino, estómago y recto, y PHOR-1 también puede expresarse en otros cánceres. La identificación de una molécula o agente biológico que pudiera inhibir la expresión o sobreexpresión de PHOR-1 en células cancerosas puede ser de valor terapéutico. Dicho agente puede identificarse usando una exploración que cuantifique la expresión de PHOR-1 por RT-PCR, hibridación de ácido nucleico o unión a anticuerpo.

Control del estado de PHOR-1 y sus productos

Los ensayos que evalúan el estado del gen de PHOR-1 y productos génicos de PHOR-1 en un individuo pueden proporcionar información sobre el potencial de crecimiento u oncogénico de una muestra biológica de este individuo. Por ejemplo, debido a que el ARNm de PHOR-1 está tan altamente expresado en cánceres de próstata, riñón, uterino, cuello uterino, estómago y rectal, y no en la mayoría de tejido normal, pueden usarse ensayos que evalúen los niveles relativos de transcritos de ARNm o proteínas PHOR-1 en una muestra biológica para diagnosticar una enfermedad asociada con una desregulación de PHOR-1, tal como cáncer, y pueden proporcionar información de pronóstico útil para definir opciones terapéuticas apropiadas. De forma similar, también pueden usarse en este contexto ensayos que evalúen la integridad de secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de PHOR-1 en una muestra biológica.

El descubrimiento de que el ARNm de PHOR-1 está tan altamente expresado en cánceres de próstata y no en la mayoría de tejidos normales proporciona pruebas de que este gen está asociado con un crecimiento celular desregulado, y por lo tanto identifica a este gen y a sus productos como dianas que el experto en la materia puede usar para evaluar muestras biológicas de individuos sospechosos de tener una enfermedad asociada con una desregulación de PHOR-1. En otro ejemplo, debido a que la expresión de PHOR-1 está normalmente restringida a próstata, también se pueden evaluar muestras biológicas tomadas de otros tejidos para detectar la expresión de PHOR-1 como un indicio de metástasis. En este contexto, la evaluación del estado de expresión de gen de PHOR-1 y sus productos puede usarse para obtener información sobre la enfermedad potencial de una muestra de tejido. Las expresiones "estado de expresión" en este contexto se usan para referirse ampliamente a la diversidad de factores implicados en la expresión, función y regulación de un gen y sus productos, tales como el nivel de expresión de ARNm, la integridad de los productos génicos expresados (tales como las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos) y modificaciones transcripcionales y traduccionales en estas moléculas.

El estado de expresión de PHOR-1 puede proporcionar información útil para predecir la susceptibilidad a fases patológicas particulares, progresión y/o agresividad tumoral. La invención proporciona procedimientos y ensayos para determinar el estado de expresión de PHOR-1 y diagnosticar cánceres que expresen PHOR-1, tales como cánceres de próstata, mama, vejiga, pulmón, hueso, colon, pancreático, testicular, cánceres de cuello uterino y de ovario. El estado de expresión de PHOR-1 en muestras de pacientes puede analizarse por varios medios bien conocidos en la técnica, incluyendo, sin limitación, análisis inmunohistoquímico, hibridación *in situ*, análisis por RT-PCR sobre muestras microdisecadas por captura con láser, análisis de transferencia de Western de muestras clínicas y líneas celulares y análisis de matrices de tejidos. Pueden encontrarse protocolos típicos para evaluar el estado de expresión del gen y productos génicos de PHOR-1, por ejemplo, en Current Protocols in Molecular Biology, Units 2 [Northern Blotting], 4 [Southern Blotting], 15 [Immunoblotting] y 18 [PCR Analysis], Frederick M. Ausubul y col. eds., 1995.

Se describen en el presente documento procedimientos para controlar productos génicos de PHOR-1 por determinación del estado de productos génicos de PHOR-1 expresados por células en una muestra de tejido de ensayo de un individuo sospechoso de tener una enfermedad asociada con un crecimiento celular desregulado (tal como hiperplasia o cáncer), y después comparación del estado determinado de este modo con el estado de productos génicos de PHOR-1 en una muestra normal correspondiente, proporcionando la presencia de productos génicos de PHOR-1 aberrantes en la muestra de ensayo respecto a la muestra normal un indicio de la presencia de un crecimiento celular desregulado dentro de las células del individuo.

En otro aspecto, la invención proporciona ensayos útiles en la determinación de la presencia de cáncer en un individuo, que comprenden detectar un aumento significativo en la expresión de ARNm o proteína PHOR-1 en una muestra celular o tisular de ensayo respecto a los niveles de expresión en la célula o tejido normal correspondiente. La presencia de ARNm de PHOR-1 puede, por ejemplo, evaluarse en muestras de tejido incluyendo, pero sin limitación, colon, pulmón, próstata, páncreas, vejiga, mama, ovario, cuello uterino, testículo, cabeza y cuello, cerebro, estómago, hueso, etc. La presencia de una expresión de PHOR-1 significativa en cualquiera de estos tejidos puede ser útil para indicar la emergencia, presencia y/o gravedad de estos cánceres o una metástasis de un cáncer que se origina en otro tejido, puesto que los tejidos normales correspondientes no expresan ARNm de PHOR-1 o lo expresan a menores niveles.

El estado de expresión de PHOR-1 puede determinarse a nivel de proteína más que a nivel de ácido nucleico. Por ejemplo, dicho procedimiento o ensayo comprendería determinar el nivel de proteína PHOR 1 expresada por células en una muestra de tejido de ensayo y comparar el nivel determinado de este modo con el nivel de PHOR-1 expresado en una muestra normal correspondiente. La presencia de proteína PHOR-1 se evalúa, por ejemplo,

usando procedimientos inmunohistoquímicos. Pueden usarse anticuerpos contra PHOR-1 o compañeros de unión capaces de detectar la expresión de proteína PHOR-1 en una diversidad de formatos de ensayo bien conocidos en la técnica con este fin.

Se puede evaluar la integridad de secuencias de nucleótidos y aminoácidos de PHOR-1 en una muestra biológica para identificar alteraciones en la estructura de estas moléculas tales como inserciones, deleciones, sustituciones y similares. Esto es útil porque se observan alteraciones en las secuencias de nucleótidos y aminoácidos en un gran número de proteínas asociadas con un fenotipo de crecimiento desregulado (véase, por ejemplo, Marrogi y col, J. Cutan. Pathol. 26(8): 369-378 (1999)). En este contexto, se conocen bien en la técnica una amplia diversidad de ensayos para observar alteraciones en las secuencias de nucleótidos y aminoácidos. Por ejemplo, el tamaño y la estructura de las secuencias de ácido nucleico o aminoácidos de productos génicos de PHOR-1 puede observarse mediante los protocolos de Northern, Southern, Western, PCR y secuenciación de ADN analizados en el presente documento. Además, se conocen bien en la técnica otros procedimientos para observar alteraciones en las secuencias de nucleótidos y aminoácidos tales como análisis de polimorfismos de conformación monocatenaria (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nº 5.382.510 y 5.952.170).

Se puede examinar el estado de metilación del gen de PHOR-1 en una muestra biológica. La desmetilación y/o hipermetilación aberrante de islas de CpG en regiones reguladoras 5' de genes se produce frecuentemente en células inmortalizadas y transformadas y puede dar como resultado una expresión alterada de diversos genes. Por ejemplo, la hipermetilación del promotor de la glutatión S-transferasa de clase pi (una proteína expresada en próstata normal pero no expresada en >90% de los carcinomas de próstata) parece silenciar permanentemente la transcripción de este gen y es la alteración genómica detectada más frecuentemente en carcinomas de próstata (De Marzo y col, Am. J. Pathol. 155(6): 1985-1992 (1999)). Además, esta alteración está presente en al menos el 70% de los casos de neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (PIN) (Brooks y col, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev., 1998, 7: 531-536).

En otro ejemplo, la expresión del gen específico de tumor LAGE-I (que no se expresa en próstata normal pero que se expresa en el 25-50% de los cánceres de próstata) se induce por desoxi-azacitidina en células linfoblastoides, sugiriendo que la expresión tumoral se debe a la desmetilación (Lete y col, 1998, Int. J. Cancer 76(6): 903-908). En este contexto, se conocen bien en la técnica una diversidad de ensayos para examinar el estado de metilación de un gen. Por ejemplo, se pueden utilizar en estrategias de hibridación de Southern enzimas de restricción sensibles a metilación que no pueden escindir secuencias que contienen sitios CpG metilados, para evaluar el estado de metilación global de islas de CpG.

Además, la MSP (PCR específica de metilación) puede generar rápidamente un perfil del estado de metilación de todos los sitios CpG presentes en una isla de CpG de un gen dado. Este procedimiento implica una modificación inicial del ADN por bisulfito sódico (que convertirá todas las citosinas no metiladas en uracilo), seguido de amplificación usando cebadores específicos para ADN metilado frente a no metilado. También pueden encontrarse protocolos que impliquen interferencia con metilación, por ejemplo, en Current Protocols in Molecular Biology, Units 12, Frederick M. Ausubel y col. eds., 1995.

También se describen ensayos útiles en la determinación de la presencia de cáncer en un individuo, que comprenden detectar un cambio significativo en las variantes de corte y empalme alternativas de PHOR-1 en una muestra celular o tisular de ensayo respecto a los niveles de expresión en la célula o tejido normal correspondiente. El control de variantes de corte y empalme alternativas de PHOR-1 es útil debido a que los cambios en el corte y empalme alternativo de proteínas se sugieren como una de las etapas en una serie de acontecimientos que conducen a la progresión de los cánceres (véase, por ejemplo, Carstens y col, Oncogene 15 (250): 3059-3065 (1997)).

La amplificación de genes proporciona un procedimiento adicional de evaluación del estado de PHOR-1. La amplificación de genes puede medirse en una muestra directamente, por ejemplo, por transferencia de Southern convencional, transferencia de Northern para cuantificar la transcripción de ARNm [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5201-5205 (1980)], transferencia puntual (análisis de ADN) o en hibridación *in situ*, usando una sonda apropiadamente marcada, basándose en las secuencias proporcionadas en el presente documento. Como alternativa, pueden emplearse anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN y dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína. Los anticuerpos a su vez pueden marcarse y puede llevarse a cabo el ensayo en el que el dúplex se une a una superficie, de modo que tras la formación del dúplex en la superficie la presencia de anticuerpo unido al dúplex puede detectarse.

Además de los tejidos analizados anteriormente, la sangre periférica puede ensayarse convenientemente para determinar la presencia de células cancerosas, incluyendo, pero sin limitación cánceres de próstata, usando RT-PCR para detectar la expresión de PHOR-1. La presencia de ARNm de PHOR-1 amplificable por RT-PCR proporciona un indicio de la presencia del cáncer. Los ensayos de detección por RT-PCR para células tumorales en sangre periférica se están evaluando actualmente para su uso en el diagnóstico y gestión de varios tumores sólidos humanos. En el campo del cáncer de próstata, estos 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 se conocen bien en la técnica.

Un aspecto de la invención relacionado se refiere a predecir la susceptibilidad a desarrollar cáncer en un individuo. En una realización, un procedimiento para predecir la susceptibilidad al cáncer comprende detectar ARNm de PHOR-1 o proteína de PHOR-1 en una muestra tisular, indicando su presencia una susceptibilidad al cáncer, en el que el grado de expresión de ARNm de PHOR-1 presente es proporcional al grado de susceptibilidad. En una realización específica, se examina la presencia de PHOR-1 en tejido de próstata, proporcionando la presencia de PHOR-1 en la muestra un indicio de susceptibilidad a cáncer de próstata (o la emergencia o existencia de un tumor de próstata). En una realización estrechamente relacionada, se puede evaluar la integridad de secuencias de nucleótidos y aminoácidos de PHOR-1 en una muestra biológica para identificar alteraciones en la estructura de estas moléculas tales como inserciones, deleciones, sustituciones y similares, proporcionando la presencia de una o más alteraciones en productos génicos de PHOR-1 en la muestra un indicio de susceptibilidad al cáncer (o la emergencia o existencia de un tumor).

También se describen en el presente documento procedimientos para estimar la agresividad tumoral. Un procedimiento para estimar la agresividad de un tumor comprende determinar el nivel de ARNm de PHOR-1 o proteína PHOR-1 expresada por células en una muestra del tumor, comparado el nivel así determinado con el nivel de ARNm de PHOR-1 o proteína PHOR-1 expresada en un tejido normal correspondiente tomado del mismo individuo o una muestra de referencia de tejido normal, en el que el grado de ARNm de PHOR-1 o expresión de proteína PHOR-1 en la muestra tumoral respecto a la muestra normal indica el grado de agresividad. La agresividad de los tumores de próstata se evalúa determinando el grado en el que se expresa PHOR-1 en las células tumorales, indicando niveles mayores de expresión tumores más agresivos. Se puede evaluar la integridad de secuencias de nucleótidos y aminoácidos de PHOR-1 en una muestra biológica para identificar alteraciones en la estructura de estas moléculas tales como inserciones, deleciones, sustituciones y similares, indicando la presencia de una o más alteraciones tumores más agresivos.

Se describen procedimientos para observar la progresión de un tumor maligno en un individuo con el tiempo. Los procedimientos para observar la progresión de un tumor maligno en un individuo con el tiempo comprenden determinar el nivel de ARNm de PHOR-1 o proteína PHOR-1 expresada por células en una muestra del tumor, comparar el nivel así determinado con el nivel de ARNm de PHOR-1 o proteína PHOR-1 expresada en una muestra de tejido equivalente tomada del mismo individuo en un momento diferente, en el que el grado de ARNm de PHOR-1 o de expresión de proteína PHOR-1 en la muestra tumoral con el tiempo proporciona información sobre la progresión del cáncer. La progresión de un cáncer se evalúa determinando el grado en el que la expresión de PHOR-1 en las células tumorales se altera con el tiempo, indicando mayores niveles de expresión una progresión del cáncer. Se puede evaluar la integridad de secuencias de nucleótidos y aminoácidos de PHOR-1 en una muestra biológica para identificar alteraciones en la estructura de estas moléculas tales como inserciones, deleciones, sustituciones y similares, indicando la presencia de una o más alteraciones una progresión del cáncer.

Las estrategias de diagnóstico anteriores pueden combinarse con uno cualquiera de una diversidad de protocolos de pronóstico y diagnóstico conocidos en la técnica. Por ejemplo, en el presente documento se desvelan procedimientos para observar una coincidencia entre la expresión de gen de PHOR-1 y productos génicos de PHOR-1 (o alteraciones en el gen de PHOR-1 y productos génicos de PHOR-1) y un factor que se asocia con tumor maligno como medio de diagnóstico y pronóstico del estado de una muestra de tejido. En este contexto, pueden utilizarse una amplia diversidad de factores asociados con tumor maligno, tales como la expresión de genes de otro modo asociados con tumor maligno (incluyendo la expresión de PSA, PSCA y PSM), así como observaciones citológicas macroscópicas (véase, por ejemplo, Bocking, y col, 1984, Anal. Quant. Cytol. 6(2): 74-88; Eptsein, 1995, Hum. Pathol. Feb 1995; 26(2): 223-9; Thorson y col, 1998, Mod. Pathol. 11(6): 543-51; Baisden y col, 1999, Am. J. Surg Pathol. 23(8):918-24). Los procedimientos para observar una coincidencia entre la expresión de gen de PHOR-1 y productos génicos de PHOR-1 (o alteraciones en el gen de PHOR-1 y productos génicos de PHOR-1) y un factor adicional que se asocia con tumor maligno son útiles, por ejemplo, debido a que la presencia de un conjunto o constelación de factores específicos que coinciden proporciona información crucial para diagnosticar y pronosticar el estado de una muestra tisular.

Son útiles procedimientos para observar una coincidencia entre la expresión de gen de PHOR-1 y productos génicos de PHOR-1 (o alteraciones en el gen de PHOR-1 y productos génicos de PHOR-1) y un factor que se asocia con malignidad que implican detectar la sobreexpresión de ARNm o proteína PHOR-1 en una muestra de tejido, detectar la sobreexpresión de ARNm o proteína PSA en una muestra de tejido y observar una coincidencia de sobreexpresión de ARNm o proteína PHOR-1 y ARNm o proteína PSA. En una realización específica, se examina la expresión de ARNm de PHOR-1 y PSA en tejido de próstata. La coincidencia de sobreexpresión de ARNm de PHOR-1 y PSA en la muestra proporciona un indicio de cáncer de próstata, susceptibilidad a cáncer de próstata o la emergencia o existencia de un tumor de próstata.

Se describen en el presente documento procedimientos para detectar y cuantificar la expresión de ARNm o proteína PHOR-1 y el uso de tecnologías de detección y cuantificación de ácidos nucleicos y proteína convencionales bien conocidas en la técnica. Los procedimientos convencionales para la detección y cuantificación de ARNm de PHOR-1 incluyen hibridación *in situ* usando ribosondas de PHOR-1 marcadas, transferencia de Northern y técnicas relacionadas usando sondas polinucleotídicas de PHOR-1, análisis de RT-PCR usando cebadores específicos para PHOR-1 y otros procedimientos de detección de tipo amplificación, tales como, por ejemplo, ADN ramificado, SISBA, TMA y similares. Puede usarse RT-PCR semicuantitativa para detectar y cuantificar la expresión de ARNm de

PHOR-1 como se describe en los Ejemplos a continuación. Puede usarse cualquier cantidad de cebadores capaces de amplificar PHOR-1 con este fin, incluyendo, pero sin limitación, los diversos conjuntos de cebadores específicamente descritos en el presente documento. Pueden usarse con este fin procedimientos convencionales para la detección y cuantificación de proteína. Pueden usarse anticuerpos policlonales o monoclonales específicamente reactivos con la proteína PHOR-1 de tipo silvestre en un ensayo inmunohistoquímico de tejido biopsiado.

Identificación de moléculas que interaccionan con PHOR-1

Las secuencias de proteína PHOR-1 desveladas en el presente documento permiten al experto en la materia identificar proteínas, moléculas pequeñas y otros agentes que interaccionan con PHOR-1 y rutas activadas por PHOR-1 a través de uno cualquiera de una diversidad de protocolos aceptados en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar uno de la diversidad de los denominados sistemas de trampa de interacciones (también denominados "ensayo de doble híbrido"). En dichos sistemas, las moléculas que interaccionan reconstituyen un factor de transcripción y dirigen la expresión de un gen indicador, cuya expresión se ensaya después. Los sistemas típicos identifican interacciones de proteína-proteína *in vivo* a través de la reconstitución de un activador transcripcional eucariota y se desvelan, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nº 5.955.280, 5.925.523, 5.846.722 y 6.004.746.

Como alternativa, se pueden identificar moléculas que interaccionen con secuencias proteicas de PHOR-1 por exploración de bibliotecas de péptidos. En dichos procedimientos, se identifican péptidos que se unen a moléculas receptoras seleccionadas tales como PHOR-1 por exploración de bibliotecas que codifican una colección aleatoria o controlada de aminoácidos. Los péptidos codificados por las bibliotecas se expresan como proteínas de fusión de proteínas de cubierta de bacteriófagos, y las partículas de bacteriófagos se exploran después contra los receptores de interés. Los péptidos que tienen una amplia diversidad de usos, tales como reactivos terapéuticos o de diagnóstico, pueden identificarse por lo tanto sin ninguna información previa sobre la estructura del ligando o molécula receptora esperada. Las bibliotecas de péptidos típicas y los procedimientos de exploración que pueden usarse para identificar moléculas que interaccionen con secuencias proteicas de PHOR-1 se desvelan, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nº 5.723.286 y 5.733.731. Se describen ensayos ejemplares para identificar moléculas que interaccionen con o alteran la función de un GPCR en Moon y col, 1999, PNAS 96(25): 14605-14610; Breer y col, 1998, Ann N. Y. Acad. Sci. 855:175-181; y Sinnett-Smith y col, 2000, J. Biol. Chem. 275 (39): 30644-30652.

Como alternativa, pueden usarse líneas celulares que expresen PHOR-1 para identificar interacciones de proteína-proteína mediadas por PHOR-1. Esta posibilidad puede examinarse usando técnicas de inmunoprecipitación como se muestra por otros (Hamilton BJ, y col. Biochem. Biophys. Res Commun. 1999, 261: 646-51). Típicamente, puede inmunoprecipitarse una proteína PHOR-1 a partir de líneas celulares de cáncer de próstata que expresen PHOR-1 usando anticuerpos anti-PHOR-1. Como alternativa, pueden usarse anticuerpos contra el marcador His en una línea celular modificada por ingeniería genética para que exprese PHOR-1 (vectores mencionados anteriormente). El complejo inmunoprecipitado puede examinarse para determinar la asociación de proteína por procedimientos tales como transferencia de Western, marcaje con 35S-metionina de proteínas, microsecuenciación de proteínas, tinción con plata y electroforesis en gel bidimensional.

Las moléculas pequeñas que interaccionen con PHOR-1 pueden identificarse a través de realizaciones relacionadas de dichos ensayos de exploración. Por ejemplo, pueden identificarse moléculas pequeñas que interfieran con la función de GPCR, incluyendo moléculas que interfieren con la capacidad de PHOR-1 para mediar la fosforilación y la desfosforilación, la señalización de segundos mensajeros y la oncogénesis. Los procedimientos típicos se analizan, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Nº 5.928.868 e incluyen procedimientos para formar ligandos híbridos en los que al menos un ligando es una molécula pequeña. En una realización ilustrativa, el ligando híbrido se introduce en células que a su vez contienen un primer y un segundo vector de expresión. Cada vector de expresión incluye ADN para expresar una proteína híbrida que codifique una proteína diana unida a una secuencia codificante para un módulo de transcripción. Las células contienen además un gen indicador, cuya expresión está condicionada por la proximidad de la primera y segunda proteínas híbridas entre sí, un acontecimiento que se produce solamente si el ligando híbrido se une a sitios diana en ambas proteínas híbridas. Las células que expresan el gen indicador se seleccionan y la molécula pequeña desconocida o la proteína híbrida desconocida se identifican.

También se describe un procedimiento de exploración para una molécula que interacciona con una secuencia de aminoácidos de PHOR-1 mostrada en la FIG. 1A-D (SEC ID Nº: 2), que comprende las etapas de poner en contacto una población de moléculas con la secuencia de aminoácidos de PHOR-1, que permite que la población de moléculas y la secuencia de aminoácidos de PHOR-1 interaccionen en condiciones que faciliten una interacción, determinar la presencia de una molécula que interacciona con la secuencia de aminoácidos de PHOR-1 y después separar las moléculas que no interaccionan con la secuencia de aminoácidos de PHOR-1 de las moléculas que interaccionan con la secuencia de aminoácidos de PHOR-1. En una realización específica, el procedimiento incluye además purificar una molécula que interacciona con la secuencia de aminoácidos de PHOR-1. En una realización preferida, la secuencia de aminoácidos de PHOR-1 se pone en contacto con una biblioteca de péptidos.

Procedimientos y composiciones terapéuticas

La identificación de PHOR-1 como proteína del cáncer de próstata abre varias estrategias terapéuticas para el tratamiento de cánceres de próstata. Como se ha analizado anteriormente, PHOR-1 es un receptor acoplado a proteína G (GPCR), y su expresión induce el crecimiento de colonias y modula el AMPc y la fosforilación de tirosina. Además, PHOR-1 presenta epítomos en la superficie celular que pueden fijarse como diana para terapia.

El perfil de expresión de PHOR-1 es reminiscente de los MAGE, PSA y PMSA, que son genes específicos de tejido que están regulados positivamente en melanomas y otros cánceres (Van den Eynde y Boon, Int J Clin Lab Res. 27: 81-86, 1997). Debido a su expresión específica de tejido y a sus altos niveles de expresión en el cáncer, estas moléculas se están investigando actualmente como dianas para vacunas contra el cáncer (Durrant, Anticancer Drugs 8: 727-733, 1997; Reynolds y col, Int J Cancer 72: 972-976, 1997). El patrón de expresión de PHOR-1 proporciona pruebas de que es asimismo una diana ideal para una estrategia de vacuna contra el cáncer para el cáncer de próstata, ya que su expresión no se detecta en la mayoría de tejidos normales. Sus características estructurales como GPCR también proporcionan pruebas de que PHOR-1 puede ser una diana molecular pequeña, así como una diana para estrategias terapéuticas basadas en anticuerpos. La estrategia terapéutica puede diseñarse para inhibir la función de GPCR de la molécula o para dirigirse a la propia molécula de PHOR-1.

Por consiguiente, se espera que las estrategias terapéuticas que se dirigen a porciones extracelulares de PHOR-1 o que tienen como objetivo inhibir la actividad de la proteína PHOR-1 sean útiles para pacientes que padecen cáncer de próstata y otros cánceres que expresan PHOR-1. Las estrategias terapéuticas que tienen como objetivo inhibir la actividad de la proteína PHOR-1 generalmente se incluyen en dos clases. Una clase comprende diversos procedimientos para inhibir la unión o asociación de la proteína PHOR-1 con su compañero de unión o con otras proteínas. Otra clase comprende una diversidad de procedimientos para inhibir la transcripción del gen de PHOR-1 o la traducción de ARNm de PHOR-1.

PHOR-1 como diana de superficie celular para terapia basada en anticuerpos

La expresión en superficie celular de PHOR-1 indica que esta molécula es una diana atractiva para estrategias terapéuticas basadas en anticuerpos. Debido a que PHOR-1 se expresa en células cancerosas y no en la mayoría de células normales, se esperaría que la administración sistémica de composiciones inmunorreactivas con PHOR-1 presentara una sensibilidad excelente sin efectos tóxicos, inespecíficos y/o no diana causados por la unión de la molécula inmunoterapéutica a órganos y tejidos no diana. Los anticuerpos específicamente reactivos con dominios extracelulares de PHOR-1 pueden ser útiles para tratar cánceres que expresen PHOR-1 de forma sistémica, como conjugados con una toxina o agente terapéutico o como anticuerpos desnudos capaces de inhibir la proliferación o función celular.

Pueden introducirse anticuerpos contra PHOR-1 en un paciente de modo que el anticuerpo se una a PHOR-1 en las células cancerosas y medie la destrucción de las células y el tumor y/o inhiba el crecimiento de las células o del tumor. Los mecanismos por los que dichos anticuerpos ejercen un efecto terapéutico pueden incluir citólisis mediada por el complemento, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, modulación de la función fisiológica de PHOR-1, inhibición de la unión a ligando o rutas de transducción de señales, modulación de la diferenciación de células tumorales, alteración de perfiles de factores de angiogénesis tumoral y/o por inducción de apoptosis. Los anticuerpos contra PHOR-1 pueden conjugarse con agentes tóxicos o terapéuticos y usarse para administrar el agente tóxico o terapéutico directamente a células tumorales portadoras de PHOR-1. Los ejemplos de agentes tóxicos incluyen, pero sin limitación, calchemicina, maitansinoides, radioisótopos tales como ¹³¹I, itrio y bismuto.

La inmunoterapia contra el cáncer usando anticuerpos anti-PHOR-1 puede seguir las enseñanzas generadas a partir de diversas estrategias que se han empleado con éxito en el tratamiento de otros tipos de cáncer, incluyendo, pero sin limitación, cáncer de colon (Arlén 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 células 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). Algunas estrategias terapéuticas implican la conjugación de un anticuerpo desnudo con una toxina, tal como la conjugación de ¹³¹I con anticuerpos anti-CD20 (por ejemplo, Bexxar, Coulter Pharmaceutical), mientras que otras implican la coadministración de anticuerpos y otros agentes terapéuticos tales como HerceptinaTM (trastuzumab) con paclitaxel (Genentech, Inc.). Para el tratamiento del cáncer de próstata, por ejemplo, los anticuerpos contra PHOR-1 pueden administrarse junto con radiación, quimioterapia o supresión hormonal.

Aunque la terapia con anticuerpos contra PHOR-1 puede ser útil para todas las fases del cáncer, la terapia con anticuerpos puede ser particularmente apropiada en cánceres avanzados o metastásicos. El tratamiento con la terapia de anticuerpos de la invención puede estar indicado para pacientes que han recibido previamente una o más quimioterapias, mientras que la combinación de la terapia de anticuerpos de la invención con un régimen quimioterápico o de radiación puede preferirse para pacientes que no han recibido tratamiento quimioterápico. Además, la terapia con anticuerpos puede permitir el uso de dosificaciones reducidas de quimioterapia

concomitante, particularmente para pacientes que no toleran muy bien la toxicidad del agente quimioterápico.

Puede ser deseable para algunos pacientes con cáncer que sean evaluados para determinar la presencia y el nivel de expresión de PHOR-1, preferentemente usando evaluaciones inmunohistoquímicas de tejido tumoral, formación de imágenes de PHOR-1 cuantitativas u otras técnicas capaces de indicar de forma fiable la presencia y el grado de expresión de PHOR-1. El análisis inmunohistoquímico de biopsias tumorales o especímenes quirúrgicos puede preferirse con este fin. Se conocen bien en la técnica procedimientos para análisis inmunohistoquímico de tejidos tumorales.

Los anticuerpos monoclonales anti-PHOR-1 útiles en el tratamiento del cáncer de próstata y otros cánceres incluyen los que son capaces de iniciar una potente respuesta inmune contra el tumor y los que son capaces de una citotoxicidad directa. A este respecto, los anticuerpos monoclonales anti-PHOR-1 (AcM) pueden generar la lisis de células tumorales por mecanismos de citotoxicidad mediada por el complemento o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), requiriendo ambos una porción Fc intacta de la molécula de inmunoglobulina para la interacción con los sitios de receptor de Fc de las células efectoras o proteínas del complemento. Además, los AcM anti-PHOR-1 que ejercen un efecto biológico directo sobre el crecimiento de tumores son útiles en la práctica de la invención. Los mecanismos potenciales por los que dichos AcM citotóxicos directamente pueden actuar incluyen la inhibición del crecimiento celular, la modulación de la diferenciación celular, la modulación de los perfiles de factores de angiogénesis tumoral y la inducción de apoptosis. El mecanismo por el que un AcM anti-PHOR-1 particular ejerce un efecto antitumoral puede evaluarse usando cualquier número de ensayos *in vitro* diseñados para determinar ADCC, ADMMC, lisis celular mediada por el complemento y, así sucesivamente, como se conocen en general en la técnica.

El uso de anticuerpos monoclonales murinos u otros no humanos, o AcM quiméricos de humano/ratón, puede inducir respuestas inmunes de moderadas a fuertes en algunos pacientes. En algunos casos, esto dará como resultado el aclaramiento del anticuerpo de la circulación y una eficacia reducida. En la mayoría de los casos graves, una respuesta inmune de este tipo puede conducir a una amplia formación de inmunocomplejos que, potencialmente, pueden causar insuficiencia renal. Por consiguiente, los anticuerpos monoclonales preferidos usados son los que son totalmente humanos o humanizados y se unen específicamente al antígeno de PHOR-1 diana con gran afinidad pero presentan escasa o ninguna antigenicidad en el paciente.

Los procedimientos terapéuticos contemplan la administración de AcM anti-PHOR-1 individuales así como combinaciones, o cócteles, de diferentes AcM. Dichos cócteles de AcM pueden tener ciertas ventajas en la medida en que contengan AcM que se dirigen a diferentes epítopos, aprovechen diferentes mecanismos efectoras o combinen directamente AcM citotóxicos con AcM que dependan de la funcionalidad de efectoras inmunes. Dichos AcM en combinación pueden presentar efectos terapéuticos sinérgicos. Además, la administración de AcM anti-PHOR-1 puede combinarse con otros agentes terapéuticos, incluyendo, pero sin limitación, diversos agentes quimioterápicos, bloqueantes de andrógenos e inmunomoduladores (por ejemplo, IL-2, GM-CSF). Los AcM anti-PHOR-1 pueden administrarse en su forma "desnuda" o no conjugada, o pueden tener agentes terapéuticos conjugados con los mismos.

Las formulaciones de anticuerpos anti-PHOR-1 pueden administrarse por cualquier vía capaz de administrar los anticuerpos en el sitio tumoral. Las vías de administración potencialmente eficaces incluyen, pero sin limitación, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intratumoral, intradérmica y similares. El tratamiento implicará generalmente la administración repetida de la preparación de anticuerpos anti-PHOR-1 a través de una vía de administración aceptable, tal como inyección intravenosa (IV), típicamente a una dosis en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal. Dosis en el intervalo de 10-500 mg de AcM por semana pueden ser eficaces y bien toleradas.

Basándose en la experiencia clínica con el AcM herceptina en el tratamiento del cáncer de mama metastásico, una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg de peso corporal de paciente IV seguida de dosis semanales de aproximadamente 2 mg/kg IV de la preparación de AcM anti-PHOR-1 puede representar un régimen de dosificación aceptable. Preferentemente, la dosis de carga inicial se administra como una infusión de 90 minutos o más prolongada. La dosis de mantenimiento periódico puede administrarse como una infusión de 30 minutos o más prolongada, con tal de que la dosis inicial sea bien tolerada. Sin embargo, como entenderá un experto en la materia, diversos factores influirán en el régimen de dosis ideal en un caso particular. Dichos factores pueden incluir, por ejemplo, la afinidad de unión y semivida del Ac o AcM usado, el grado de expresión de PHOR-1 en el paciente, el grado de antígeno PHOR-1 desprendido circulante, el nivel de concentración de anticuerpo en estado estacionario deseado, la frecuencia de tratamiento y la influencia de los agentes quimioterápicos usados en combinación con el procedimiento de tratamiento de la invención.

Óptimamente, los pacientes deberían evaluarse para determinar el nivel de antígeno PHOR-1 desprendido circulante en suero para contribuir a la determinación del régimen de dosificación más eficaz y factores relacionados. Dichas evaluaciones también pueden usarse con fines de control durante toda la terapia y pueden ser útiles para estimar el éxito terapéutico en combinación con la evaluación de otros parámetros (tales como los niveles de PSA en suero en la terapia del cáncer de próstata).

Inhibición de la función de la proteína PHOR-1

Son útiles diversos procedimientos y composiciones para inhibir la unión de PHOR-1 a su compañero de unión o ligando, o su asociación con otra u otras proteínas, así como procedimientos para inhibir la función de PHOR-1. Las moléculas que se dirigen al extremo N-terminal de PHOR-1, tales como el anticuerpo descrito en los ejemplos a continuación, son particularmente atractivas para inhibir la función de la proteína debido a que es probable que se dirijan a un sitio de unión a ligando en PHOR-1.

Inhibición de PHOR-1 con proteínas recombinantes

En una estrategia, las moléculas recombinantes que son capaces de unirse a PHOR-1 impidiendo de este modo el acceso/unión de PHOR-1 a su compañero o compañeros de unión o la asociación con otra u otras proteínas se usan para inhibir la función de PHOR-1. Dichas moléculas recombinantes pueden contener, por ejemplo, la parte o partes reactivas de una molécula de anticuerpo específica de PHOR-1. El dominio de unión a PHOR-1 de un compañero de unión a PHOR-1 puede modificarse por ingeniería genética en una proteína de fusión dimérica que comprende dos dominios de unión a ligando de PHOR-1 unidos a la porción Fc de una IgG humana, tal como IgG1 humana. Dicha porción de IgG puede contener, por ejemplo, los dominios CH2 y CH3 y la región de bisagra, pero no el dominio CH1. Dichas proteínas de fusión diméricas pueden administrarse en forma soluble a pacientes que padecen un cáncer asociado con la expresión de PHOR-1, incluyendo, pero sin limitación, cánceres de próstata, mama, vejiga, pulmón, hueso, colon, pancreático, testicular, cuello uterino y ovárico, en los que la proteína de fusión dimérica se une específicamente a PHOR-1 bloqueando de este modo la interacción de PHOR-1 con un compañero de unión. Dichas proteínas de fusión diméricas pueden combinarse adicionalmente en proteínas multiméricas usando tecnologías de unión de anticuerpos conocidas.

Inhibición de PHOR-1 con anticuerpos intracelulares

En otra estrategia, vectores recombinantes que codifican anticuerpos de cadena sencilla que se unen específicamente a PHOR-1 pueden introducirse en células que expresan PHOR-1 mediante tecnologías de transferencia de genes, en las que el anticuerpo anti-PHOR-1 de cadena sencilla codificado se expresa intracelularmente, se une a la proteína PHOR-1 y de este modo inhibe su función. Los procedimientos para generar por ingeniería genética dichos anticuerpos de cadena sencilla intracelulares son bien conocidos. Dichos anticuerpos intracelulares, también conocidos como "intracuerpos", pueden dirigirse específicamente a un compartimento particular dentro de la célula, proporcionando control sobre donde se centrará la actividad inhibidora del tratamiento. Esta tecnología se ha aplicado con éxito en la técnica (para una revisión, véase Richardson y Marasco, 1995, TIBTECH vol. 13). Se ha demostrado que los anticuerpos eliminan prácticamente la expresión de receptores de superficie celular de otro modo abundantes. Véase, por ejemplo, Richardson y col., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 3137-3141; Beerli y col., 1994, J. Biol. Chem. 269: 23931-23936; Deshane y col., 1994, Gene Ther. 1: 332-337.

Los anticuerpos de cadena sencilla comprenden los dominios variables de la cadena pesada y ligera unidos por un polipéptido de engarce flexible y se expresan como un solo polipéptido. Opcionalmente, los anticuerpos de cadena sencilla pueden expresarse como un fragmento de región variable de cadena sencilla unido a la región constante de cadena ligera. Señales de tránsito intracelular bien conocidas pueden introducirse por ingeniería genética en vectores polinucleotídicos recombinantes que codifican dichos anticuerpos de cadena sencilla para dirigir con precisión el intracuerpo expresado al compartimento intracelular deseado. Por ejemplo, los intracuerpos dirigidos al retículo endoplásmico (RE) pueden modificarse por ingeniería genética para incorporar un péptido líder y, opcionalmente, una señal de retención en RE C-terminal, tal como el motivo aminoacídico KDEL. Los intracuerpos destinados a ejercer su actividad en el núcleo pueden modificarse por ingeniería genética para incluir una señal de localización nuclear. Pueden unirse restos de lípidos a intracuerpos para unir el intracuerpo al lado citosólico de la membrana plasmática. Los intracuerpos también pueden dirigirse para ejercer su función en el citosol. Por ejemplo, pueden usarse intracuerpos citosólicos para secuestrar factores dentro del citosol, impidiendo de este modo que se transporten a su destino celular natural.

En una realización, los intracuerpos contra PHOR-1 están diseñados para unirse específicamente a un dominio de PHOR-1 particular. Por ejemplo, pueden usarse intracuerpos citosólicos que se unen específicamente a la proteína PHOR-1 para impedir que moléculas relacionadas con PHOR-1 obtengan acceso al núcleo, impidiendo de este modo que ejerzan cualquier actividad biológica dentro del núcleo.

Para dirigir la expresión de dichos intracuerpos específicamente a células tumorales particulares, la transcripción del intracuerpo puede ponerse bajo el control regulador de un promotor y/o potenciador específico de tumor apropiado. Para dirigir la expresión de intracuerpos específicamente a próstata, por ejemplo, puede utilizarse el promotor y/o promotor/potenciador de PSA (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.919.652).

Inhibición de la transcripción o traducción de PHOR-1

Dentro de otra clase de estrategias terapéuticas, se usan diversos procedimientos y composiciones para inhibir la transcripción del gen de PHOR-1. De forma similar, la invención también proporciona procedimientos y composiciones para inhibir la traducción de ARNm de PHOR-1 en proteína.

En una estrategia, un procedimiento de inhibición de la transcripción del gen de PHOR-1 comprende poner en contacto el gen de PHOR-1 con un polinucleótido antisentido de PHOR-1. En otra estrategia, un procedimiento de inhibición de la traducción de ARNm de PHOR-1 comprende poner en contacto el ARNm de PHOR-1 con un polinucleótido antisentido. En otra estrategia, puede usarse una ribozima específica de PHOR-1 para escindir el mensaje de PHOR-1, inhibiendo de este modo la traducción. Dichos procedimientos basados en ribozimas y antisentido también pueden dirigirse a las regiones reguladoras del gen de PHOR-1, tales como los elementos promotores y/o potenciadores de PHOR-1. De forma similar, pueden usarse proteínas capaces de inhibir un factor de transcripción de gen de PHOR-1 para inhibir la transcripción de ARNm de PHOR-1. Se han descrito anteriormente diversos polinucleótidos y composiciones útiles en los procedimientos mencionados anteriormente. El uso de moléculas antisentido y ribozimas para inhibir la transcripción y traducción es bien conocido en la técnica.

Otros factores que inhiben la transcripción de PHOR-1 por interferencia con la activación transcripcional de PHOR-1 también pueden ser útiles para el tratamiento de cánceres que expresen PHOR-1. De forma similar, los factores que son capaces de interferir con el procesamiento de PHOR-1 pueden ser útiles para el tratamiento de cánceres que expresen PHOR-1. También son útiles procedimientos de tratamiento del cáncer que utilizan dichos factores.

Consideraciones generales para estrategias terapéuticas

Pueden usarse tecnologías de transferencia de genes y terapia génica para administrar moléculas polinucleotídicas terapéuticas a células tumorales que sintetizan PHOR-1 (es decir, antisentido, ribozima, polinucleótidos que codifiquen intracuerpos y otras moléculas inhibidoras de PHOR-1). Se conocen en la técnica varias estrategias de terapia génica. Los vectores recombinantes que codifican polinucleótidos antisentido de PHOR-1, ribozimas, factores capaces de interferir con la transcripción de PHOR-1, y así sucesivamente, pueden administrarse a células tumorales diana usando dichas estrategias de terapia génica.

Las estrategias terapéuticas anteriores pueden combinarse con una cualquiera de una amplia diversidad de regímenes de quimioterapia o terapia de radiación. Estas estrategias terapéuticas también pueden permitir el uso de dosificaciones reducidas de quimioterapia y/o una administración menos frecuente, particularmente en pacientes que no toleren bien la toxicidad del agente quimioterápico.

La actividad antitumoral de una composición particular (por ejemplo, antisentido, ribozima, intracuerpo) o una combinación de dichas composiciones puede evaluarse usando diversos sistemas de ensayo *in vitro* e *in vivo*. Los ensayos *in vitro* para evaluar el potencial terapéutico incluyen ensayos de crecimiento celular, ensayos de agar blando y otros ensayos indicativos de una actividad promotora de tumores, ensayos de unión capaces de determinar el grado en el que una composición terapéutica inhibirá la unión de PHOR-1 a un compañero de unión, etc.

In vivo, el efecto de una composición terapéutica de PHOR-1 puede evaluarse en un modelo animal adecuado. Por ejemplo, los modelos de cáncer de próstata xenogénicos en los que se introducen explantes de cáncer de próstata humano o tejidos de xenoinjertos pasados en animales inmunocomprometidos, tales como ratones atímicos o SCID, son apropiados en relación con el 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 capaces de recapitular el desarrollo de tumores primarios, micrometástasis, y la formación de metástasis osteoblásticas características de la enfermedad en fase tardía. La eficacia puede predecirse usando ensayos que midan la inhibición de la formación de tumores, la regresión de tumores o metástasis y similares. Véanse también los Ejemplos a continuación.

Los ensayos *in vivo* que cualifican la promoción de la apoptosis también pueden ser útiles en la evaluación de composiciones terapéuticas potenciales. En una realización, los xenoinjertos de ratones portadores tratados con la composición terapéutica pueden examinarse para determinar la presencia de focos apoptóticos y compararse con ratones portadores de xenoinjertos de control sin tratar. La medida en que se encuentran focos apoptóticos en los tumores de los ratones tratados proporciona un indicio de la eficacia terapéutica de la composición.

Las composiciones terapéuticas usadas en la práctica de los procedimientos anteriores 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 la composición terapéutica, conserva la función antitumoral de la composición terapéutica y no es reactivo con el sistema inmune del paciente. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, cualquiera de varios vehículos farmacéuticos convencionales, tales como soluciones salinas tamponadas con fosfato estériles, agua bacteriostática y similares (véase en general Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª Edición, A. Osal., Ed., 1980).

Las formulaciones terapéuticas pueden solubilizarse y administrarse por cualquier vía capaz de administrar la composición terapéutica al sitio tumoral. Las vías de administración potencialmente eficaces incluyen, pero sin limitación, intravenosa, parenteral, intraperitoneal, intramuscular, intratumoral, intradérmica, intraorgánica, ortotópica y similares. Una formulación preferida para inyección intravenosa comprende la composición terapéutica en una solución de agua bacteriostática conservada, agua no conservada estéril, y/o diluida en bolsas de cloruro de polivinilo o polietileno que contienen cloruro sódico estéril al 0,9% para inyección, USP. Las preparaciones de proteína terapéuticas pueden liofilizarse y almacenarse como polvos estériles, preferentemente al vacío, y después

reconstituirse en agua bacteriostática que contiene, por ejemplo, conservante de alcohol bencílico, o en agua estéril antes de la inyección.

Las dosificaciones y los protocolos de administración para el tratamiento de cánceres usando los procedimientos anteriores variarán con el procedimiento y el cáncer diana y dependerán generalmente de varios otros factores apreciados en la técnica.

Vacunas contra el cáncer

También se describen vacunas contra el cáncer que comprenden una proteína PHOR-1 o fragmento de la misma, así como vacunas basadas en ADN. En vista de la expresión restringida a próstata y a tumor de PHOR-1, se espera que las vacunas para el cáncer contra PHOR-1 sean eficaces para prevenir y/o tratar específicamente cánceres que expresen PHOR-1 sin crear efectos inespecíficos en tejidos no diana. El uso de un antígeno tumoral en una vacuna para generar inmunidad humoral y mediada por células para su uso en la terapia anticáncer es bien conocido en la técnica y se ha empleado en el cáncer de próstata usando inmunógenos de PSMA humano y PAP de roedor (Hodge y col., 1995, Int. J. Cancer 63: 231-237; Fong y col., 1997, J. Immunol. 159: 3113-3117).

Dichos procedimientos pueden ponerse en práctica fácilmente empleando una proteína PHOR-1, o fragmento de la misma, o una molécula de ácido nucleico que codifique PHOR-1, y vectores recombinantes capaces de expresar y presentar de forma apropiada el inmunógeno de PHOR-1.

Por ejemplo, pueden usarse sistemas de administración de genes virales para administrar una molécula de ácido nucleico que codifique PHOR-1. Diversos sistemas de administración de genes virales que pueden usarse en la práctica de este aspecto de la invención incluyen, pero sin limitación, virus vaccinia, virus de la viruela aviar, virus de la viruela del canario, adenovirus, virus influenza, poliovirus, virus adenoasociados, lentivirus y virus sindbis (Restifo, 1996, Curr. Opin. Immunol. 8: 658-663). También pueden emplearse sistemas de administración no virales usando un ADN desnudo que codifica una proteína PHOR-1 o fragmento de la misma introducido en el paciente (por ejemplo, por vía intramuscular) para inducir una respuesta antitumoral. En una realización, puede emplearse el ADNc de PHOR-1 humano de longitud completa.

La vacuna para el cáncer contra PHOR-1 puede basarse en la identificación de péptidos inmunogénicos dentro de la secuencia de aminoácidos de PHOR-1 mostrada en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2). Como se analiza adicionalmente en los ejemplos a continuación, se ha demostrado que porciones específicas de PHOR-1 inducen respuestas de linfocitos T y B. Una proteína de fusión con GST que incluye los aminoácidos 86-310 de PHOR-1 (FIG. 1A-D; SEC ID N°: 2) se ha usado para generar una respuesta inmune en ratones para la producción de anticuerpos monoclonales. Esta misma proteína de fusión de GST-PHOR-1, así como dos péptidos correspondientes a los aminoácidos 1-14 (MVDPNGNESSATYF; SEC ID N°: 8) y 262-274 (VHRFSKRDRSPLP; SEC ID N°: 9) de PHOR-1, se han usado para generar una respuesta inmune en conejos para la producción de anticuerpos policlonales. Por lo tanto, estas porciones específicas de PHOR-1 y los polinucleótidos que codifican estas porciones pueden seleccionarse para la producción de una vacuna contra el cáncer.

Pueden emplearse moléculas de ácido nucleico de PHOR-1 que codifican epítomos específicos de linfocitos T citotóxicos (CTL). Pueden determinarse epítomos de CTL usando algoritmos específicos (por ejemplo, Epimer, Brown University) para identificar péptidos dentro de una proteína PHOR-1 que son capaces de unirse óptimamente a los alelos de HLA especificados. Un algoritmo adecuado es el algoritmo de búsqueda de motivos peptídicos de HLA disponible en el sitio web de Bioinformatics and Molecular Analysis Section (BIMAS) web site (<http://bimas.dcrf.nih.gov/>). Este algoritmo se basa en la unión de secuencias peptídicas específicas en la hendidura de moléculas de HLA clase I y, específicamente, HLA-A2 (Falk y col., 1991, Nature 351: 290-6; Hunt y col., 1992, Science 255: 1261-3; Parker y col., 1992, J. Immunol. 149: 3580-7; Parker y col., 1994, J. Immunol. 152: 163-75). El algoritmo de búsqueda de motivos peptídicos de HLA permite la localización y clasificación de péptidos de 8 monómeros, 9 monómeros y 10 monómeros a partir de una secuencia proteica completa para predecir la unión a HLA-A2, así como otras moléculas de Clase I. La mayoría de los péptidos de unión a HLA-A2 son de 9 monómeros, que contienen favorablemente una leucina en la posición 2 y una valina o leucina en la posición 9 (Parker y col., 1992, J. Immunol. 149: 3580-7). La unión real de péptidos a HLA-A2 puede evaluarse por estabilización de la expresión de HLA-A2 en la línea celular de procesamiento de antígenos defectuoso T2 (Xue y col., 1997, Prostate 30: 73-8; Peshwa y col., 1998, Prostate 36: 129-38). La inmunogenicidad de péptidos específicos puede evaluarse *in vitro* por estimulación de CTL CD8+ en presencia de células dendríticas (Xue y col.; Peshwa y col., anteriormente).

También pueden emplearse diversas estrategias *ex vivo*. Una estrategia implica el uso de células dendríticas para presentar el antígeno PHOR-1 al sistema inmune de un paciente. Las células dendríticas expresan MHC clase I y II, coestimulador B7 e IL-12 y, por tanto, son células presentadoras de antígeno altamente especializadas. En el cáncer de próstata, las células dendríticas autólogas estimuladas con péptidos del antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) se están usando en un ensayo clínico de Fase I para estimular los sistemas inmunes 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 de PHOR-1 a linfocitos T en el contexto de moléculas de MHC clase I y II. En una realización, las células dendríticas autólogas se estimulan con péptidos de PHOR-1 capaces de unirse a moléculas de MHC. En otra realización, las células dendríticas se estimulan con la proteína

PHOR-1 completa. Otra realización más implica modificar por ingeniería genética la sobreexpresión del gen de PHOR-1 en células dendríticas usando diversos vectores de aplicación 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 adenoasociados, transfección de ADN (Ribas y col., 1997, Cancer Res. 57: 2865-2869), y transfección de ARN derivado de tumores (Ashley y col., 1997, J. Exp. Med. 186: 1177-1182). Las células que expresan PHOR-1 también pueden modificarse por ingeniería genética para expresar inmunomoduladores, tales como GM-CSF, y usarse como agentes inmunizantes.

También pueden usarse anticuerpos anti-PHOR-1 anti-idiotípicos en la terapia anticáncer como una vacuna para inducir una respuesta inmune contra células que expresen una proteína PHOR-1. En concreto, la generación de anticuerpos anti-idiotípicos es bien conocida en la técnica y puede adaptarse fácilmente para generar anticuerpos anti-PHOR-1 anti-idiotípicos que mimeticen un epítipo en una proteína PHOR-1 (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). Dicho anticuerpo anti-idiotípico puede usarse en estrategias de vacunas contra el cáncer.

Pueden emplearse procedimientos de inmunización genética para generar respuestas inmunes humores y celulares profilácticas o terapéuticas dirigidas contra células cancerosas que expresen PHOR-1. Las construcciones que comprenden ADN que codifica una proteína/inmunógeno PHOR-1 y secuencias reguladoras apropiadas pueden inyectarse directamente en el músculo o en la piel de un individuo, de modo que las células del músculo o de la piel capten la construcción y expresen la proteína/inmunógeno PHOR-1 codificado. La expresión de la proteína/inmunógeno PHOR-1 da como resultado la generación de una inmunidad humoral y celular profiláctica o terapéutica contra cánceres de próstata y otros cánceres que expresen PHOR-1. 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).

Kits

Para su uso en las aplicaciones de diagnóstico y terapéuticas descritas o sugeridas anteriormente, también se proporcionan kits. Dichos kits pueden comprender un medio de vehículo que esté compartimentalizado para recibir en estrecho confinamiento uno o más medios recipientes tales como viales, tubos y similares, comprendiendo cada uno de los medios recipientes uno de los elementos separados a usar en el procedimiento. Por ejemplo, uno de los medios recipientes puede comprender una sonda que esté o pueda marcarse de forma detectable. Dicha sonda puede ser un anticuerpo o polinucleótido específico para una proteína PHOR-1 o un gen o mensaje de PHOR-1, respectivamente. Cuando el kit utilice la hibridación de ácidos nucleicos para detectar el ácido nucleico diana, el kit también puede tener recipientes que contengan un nucleótido o nucleótidos para la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana y/o un recipiente que comprenda un medio indicador, tal como una proteína de unión a biotina, tal como avidina o estreptavidina, unida a una molécula indicadora, tal como un marcador enzimático, fluorescente o radioisótopo.

El kit comprenderá típicamente el recipiente descrito anteriormente y uno o más recipientes distintos que comprenden materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones para su uso. Puede estar presente una etiqueta en el recipiente para indicar que la composición se usa para una terapia o aplicación no terapéutica específica, y también puede indicar instrucciones para su uso *in vivo* o *in vitro*, tales como las descritas anteriormente.

El ADNc de PHOR-1 se depositó bajo los términos del Tratado de Budapest el 2 de julio de 1999 en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, Estados Unidos) como el plásmido p101P3A11, y se le ha asignado el N° de Acceso PTA-312.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Aislamiento generado por SSH de fragmentos de ADNc del gen de PHOR-1

Materiales y procedimientos

Xenoinjertos de LAPC:

Se obtuvieron xenoinjertos de LAPC del Dr. Charles Sawyers (UCLA) y se generaron como se ha descrito (Klein y col., 1997, Nature Med. 3: 402-408; Craft y col., 1999, Cancer Res. 59: 5030-5036). Se cultivaron xenoinjertos de LAPC-4 dependientes e independientes de andrógenos (LAPC-4 AD y AI, respectivamente) y xenoinjertos de LAPC-9 (LAPC-9 AD y AI, respectivamente) en ratones SCID de macho intactos o en machos castrados, respectivamente, y se pasaron como pequeños trozos de tejido en machos receptores. Los xenoinjertos de LAPC-4 AI se obtuvieron de tumores de LAPC-4 AD y los xenoinjertos de LAPC-9 AI se obtuvieron de tumores de LAPC-9 AD. Para generar los xenoinjertos AI, los ratones macho portadores de tumores de LAPC AD se castraron y se mantuvieron durante 2-3 meses. Después de que los tumores de LAPC volvieron a crecer, los tumores se extirparon y se pasaron en machos castrados o en ratones SCID hembra.

Líneas celulares:

Se obtuvieron líneas celulares humanas (por ejemplo, HeLa) a partir de la ATCC y se mantuvieron en DMEM con suero fetal de ternera al 10%.

Aislamiento de ARN:

5 Se homogeneizó tejido tumoral y líneas celulares en reactivo Trizol (Life Technologies, Gibco BRL) usando 10 ml/g de tejido o 10 ml/10⁸ células para aislar el ARN total. Se purificó el ARN poli A a partir del ARN total usando kits Mini y Midi de ARNm Oligotex de Qiagen. El ARNm y el ARN total 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.

10 DPNCN (cebador de síntesis de ADNc) (SEC ID N°: 21):
5'TTTTGATCAAGCTT303'

Adaptador 1 (SEC ID N°: 22 y 23, respectivamente):

5'CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCCGGGCAG3'
3'GGCCCGTCCTAG5'

Adaptador 2 (SEC ID N°: 24 y 25, respectivamente):

5'GTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAG3'
3'CGGCTCCTAG5'

15

Cebador de PCR 1 (SEC ID N°: 26):
5'CTAATACGACTCACTATAGGGC3'

Cebador anidado (NP)1 (SEC ID N°: 27):
5'TCGAGCGGCCGCCCCGGGCAGGA3'

20 Cebador anidado (NP)2 (SEC ID N°: 28):
5'AGCGTGGTCGCGGCCGAGGA3'

Hibridación sustractiva por supresión:

25 Se usó hibridación sustractiva por supresión (SSH) para identificar los ADNc correspondientes a genes que pueden estar regulados positivamente en el cáncer de próstata dependiente de andrógenos en comparación con el cáncer independiente de andrógenos.

30 Se sintetizaron los ADNc bicatenarios correspondientes al xenoinjerto de LAPC-4 AD 14 días post-castración (de ensayo) y el xenoinjerto de LAPC-4 AD (accionador) a partir de 2 µg de ARN poli(A)+ aislado a partir de tejido de xenoinjerto, como se ha descrito anteriormente, usando el kit de sustracción de ADNc PCR-Select de CLONTECH y 1 ng de oligonucleótido DPNCN como cebador. La síntesis de primera y segunda cadena se llevó a cabo como se describe en el protocolo del manual de usuario del kit (N° de protocolo de CLONTECH PT1117-1, N° de catálogo K1804-1). El ADNc resultante se digirió con Dpn II durante 3 h a 37°C. El ADNc digerido se extrajo con fenol/cloroformo (1:1) y se precipitó con etanol.

35 Se generó ADNc accionador (LAPC-4 AD) por combinación de una proporción 1:1 de ADNc de LAPC-4 AD digerido con Dpn II con una mezcla de ADNc digeridos derivados de hiperplasia prostática benigna (BPH) humana, las líneas celulares humanas HeLa, 293, A431, Colo205 e hígado de ratón.

40 Se generó ADNc de ensayo (LAPC-4 AD, 14 días post-castración) por dilución de 1 µl de ADNc de LAPC-4 AD 14 días post-castración digerido con Dpn II (400 ng) en 5 µl de agua. El ADNc diluido (2 µl, 160 ng) se ligó después con 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 una noche, usando 400 u de ADN ligasa T4 (CLONTECH). La ligación se terminó con 1 µl de EDTA 0,2 M y calentamiento a 72°C durante 5 min.

45 La primera hibridación se realizó por adición de 1,5 µl (600 ng) de ADN accionador a cada uno de dos tubos que contenían 1,5 µl (20 ng) de ADNc de ensayo ligado a Adaptador 1 y Adaptador 2. En un volumen final de 4 µl, las muestras se cubrieron con aceite mineral, se desnaturalizaron en un termociclador MJ Research a 98°C durante 1,5 minutos y después se dejó que hibridaran durante 8 h a 68°C. Las dos hibridaciones se mezclaron después juntas con 1 µl adicional de ADNc accionador desnaturalizado fresco y se dejó que hibridaran durante una noche a 68°C. La segunda hibridación se diluyó después en 200 µl de Hepes 20 mM, pH 8,3, NaCl 50 mM, EDTA 0,2 mM,

calentado a 70°C durante 7 min y almacenado a -20°C.

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

Para amplificar los 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 de cebador de PCR 1 (10 µM), 0,5 µl de mezcla de dNTP (10 µM), 2,5 µl de tampón de reacción 10 x (CLONTECH) y 0,5 µl de mezcla de ADNc polimerasa Advantage 50 x (CLONTECH) en un volumen final de 25 µl. La PCR 1 se realizó usando las condiciones siguientes: 75°C durante 5 min, 94°C durante 25 s, después 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 combinaron y se diluyeron 1:10 con agua. Para la reacción de PCR secundaria, se añadió 1 µl de la reacción de PCR primaria combinada y diluida a la misma mezcla de reacción que se usó para la PCR 1, excepto por que se usaron los cebadores NP1 y NP2 (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%.

Los productos de PCR se insertaron en PCR 2.1 usando el kit de clonación de vector T/A (Invitrogen). Las *E. coli* transformadas se sometieron a selección de azules/blancas y ampicilina. Se escogieron las colonias blancas y se dispusieron en placas de 96 pocillos y se cultivaron en cultivo líquido durante una noche. Para identificar insertos, se realizó una amplificación por PCR en 1 ml de cultivo bacteriano usando las condiciones de PCR1 y NP1 y NP2 como cebadores. Los productos de PCR se analizaron usando electroforesis en gel de agarosa al 2%.

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

Análisis de expresión por RT-PCR

Se generaron ADNc de primera cadena a partir de 1 µg de ARNm cebado con oligo(dT)12-18 usando el sistema de preamplificación Superscript de Gibco-BRL. Se usó el protocolo de los fabricantes e incluía una incubación durante 50 min a 42°C con transcriptasa inversa, seguida de tratamiento con ARNasa 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. Se obtuvieron ADNc de primera cadena a partir de 16 tejidos humanos normales diferentes de Clontech.

La normalización de los ADN de primera cadena a partir de múltiples tejidos se realizó usando los cebadores 5'atatcgccgcgtcgctgcgtcgacaa3' (SEC ID N°: 29) y 5'agccacacgcagct cattgtagaagg 3' (SEC ID N°: 30) para amplificar la β-actina. Se amplificó ADNc de primera cadena (5 µl) en un volumen total de 50 µl que contenía cebadores 0,4 µM, 0,2 µM de cada dNTP, tampón de PCR 1X (Clontech, Tris-HCl 10 mM, MgCl2 1,5 mM, KCl 50 mM, pH 8,3) y ADN polimerasa KlenTaq 1X (Clontech). Se retiraron cinco µl de la reacción de PCR a los 18, 20 y 22 ciclos y se usaron para una electroforesis en gel de agarosa. La PCR se realizó usando un termociclador MJ Research en las condiciones siguientes: la desnaturalización inicial era 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, las intensidades de banda de las bandas de β-actina de 283 pb de múltiples tejidos se compararon por inspección visual. Se calcularon los factores de dilución para los ADNc de primera cadena para dar como resultado intensidades de banda de β-actina equivalentes en todos los tejidos después de 22 ciclos de PCR. Fueron necesarias tres rondas de normalización para conseguir intensidades de banda equivalentes en todos los tejidos después de 22 ciclos de PCR.

Para determinar los niveles de expresión del gen de PHOR-1, se analizaron 5 µl de ADNc de primera cadena normalizado por PCR usando 25, 30 y 35 ciclos de amplificación usando las parejas de cebadores siguientes, que fueron diseñadas con la ayuda de (MIT; para detalles véase www.genome.wi.mit.edu) (SEC ID N°: 31 y 32, respectivamente):

101P3A11.1 ATCCTGACTAGGTTGTGGTTGGAG
101P3A11.2 TGTGGTTGGGAGTTCTAAAGAGGA

El análisis de expresión semicuantitativo se consiguió por comparación de los productos de PCR a números de ciclo que proporcionan intensidades de banda ligeras.

Resultados

Se realizaron varios experimentos de SSH como se describe en los Materiales y procedimientos, anteriormente, y condujeron al aislamiento de numerosos clones de fragmentos génicos candidato. Todos los clones candidatos se secuenciaron y se sometieron a análisis de homología frente a todas las secuencias en las bases de datos de genes y EST públicas principales para proporcionar información sobre la identidad del gen correspondiente y para contribuir a guiar la decisión de analizar un gen particular para una expresión diferencial. En general, los fragmentos génicos que no tenían homología con ninguna secuencia conocida en ninguna de las bases de datos en las que se

realizaron búsquedas y, por tanto, considerados que representaban nuevos genes, así como los fragmentos génicos que mostraban homología con etiquetas de secuencia expresada (EST) previamente secuenciadas, se sometieron a un análisis de expresión diferencial por RT-PCR y/o análisis de Northern.

Uno de los clones de SSH, que comprende aproximadamente 427 pb, no mostraba homología con ningún gen conocido y se denominó 101P3A11. Este clon representa un fragmento del ADNc de longitud completa que codifica PHOR-1, como se muestra en la FIG. 1A (véase también el Ejemplo 2). La secuencia del fragmento de SSH 101P3A11 se muestra en la FIG. 3.

El análisis por RT-PCR inicial (FIG 5A-B) mostró expresión de 101P3A11 solamente en próstata, LAPC-4 AD, LAPC-4 AD 3 días y LAPC-4 AD 14 días post-castración, pero no en LAPC-4 AI. Se detectó una expresión menor en ovario.

Ejemplo 2: Aislamiento de ADNc codificante de PHOR-1 de longitud completa

Se aisló un ADNc de longitud completa (GTH10) de 3136 pb a partir de una biblioteca de próstata, que puso de manifiesto una ORF de 317 aminoácidos (FIG. 1A-D). La secuencia de la proteína pone de manifiesto 7 dominios transmembrana y tiene una homología con receptores acoplados a proteína G (GPCR) implicados en la olfacción (Raming y col., 1993, Nature 361: 353; Malnic y col., 1999, Cell 96: 713). La secuencia más homóloga a 101P3A11 es un receptor olfatorio de rata expresado en cerebro conocido como RA1c (Raming y col., 1998, Receptor Channels 6: 141). Tiene una identidad del 59,9% con RA1c en un solapamiento de 299 restos. El homólogo humano de RA1c es probable que sea HPRAJ70, un GPCR específico de próstata identificado por Human Genome Sciences (documentos US 5756309, WO 96/39435). Se muestran alineamientos de ambos genes con 101P3A11 en la FIG. 2. El ADNc de 101P3A11 de longitud completa codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad del 59,4% con HPRAJ70 en un solapamiento de 298 restos. La homología de 101P3A11 con receptores olfatorios cerebrales condujo a los presentes inventores a denominar al gen Homólogo de Próstata del Receptor Olfatorio 1 (PHOR-1). Las proteínas que son miembros de esta familia de receptores presentan un extremo amino-terminal extracelular, tres bucles extracelulares adicionales, tres bucles intracelulares y un extremo carboxilo-terminal intracelular. La segunda región extracelular de PHOR-1 presenta un sitio de N-glicosilación potencial en el resto 90 (NST) sugiriendo que la proteína puede estar glicosilada.

El ADNc de PHOR-1 de longitud completa (p101P3A11, clon GTH10) se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo el 2 de julio de 1999 y se le asignó el número de acceso PTA-312.

Ejemplo 3: Análisis de la expresión génica de PHOR-1

La expresión de ARNm de PHOR-1 en tejidos humanos normales se analizó primero por transferencia de Northern de dos transferencias de múltiples tejidos (Clontech; Palo Alto, California), que comprenden un total de 16 tejidos humanos normales diferentes, usando el fragmento de SSH 101P3A11 marcado (Ejemplo 1) como sonda. Las muestras de ARN se normalizaron cuantitativamente con una sonda de β -actina. Los resultados de este análisis se muestran en las FIG. 6A-6C. La expresión de un transcrito de 3,5 kb se detectó solamente en próstata normal.

La expresión de PHOR-1 en tejidos normales se analizó adicionalmente usando una transferencia puntual de ARN multi-tejido que contenía 76 muestras diferentes (que representan principalmente tejidos normales, así como unas pocas líneas celulares de cáncer) y demostró una fuerte expresión de PHOR-1 solamente en próstata (FIG. 7). Se detecta una expresión significativamente menor en tejidos cardíacos.

Además, puede usarse RT-PCR para analizar la expresión de PHOR-1 en diversos tejidos, incluyendo cánceres obtenidos de pacientes. Se generaron ADNc de primera cadena a partir de 1 μ g de ARNm con cebado con oligo (dT) 12-18 usando el sistema de preamplificación Superscript de Gibco-BRL. Puede usarse el protocolo de los fabricantes e incluye una incubación durante 50 min a 42°C con transcriptasa inversa, seguida de tratamiento con ARNasa H a 37°C durante 20 min. Después de completarse la reacción, el volumen se aumenta hasta 200 μ l con agua antes de la normalización. Se prepararon ADNc de primera cadena a partir de diversos tejidos de interés. La normalización puede realizarse por PCR usando cebadores para actina y GAPDH. La PCR semicuantitativa se realizó usando cebadores para PHOR-1.

Ejemplo 4: Expresión de PHOR-1 en xenoinjertos de cáncer de próstata y muestras de pacientes

Análisis de Northern de xenoinjertos de cáncer de próstata y especímenes clínicos

Para analizar la expresión de PHOR-1 en tejidos de cáncer de próstata, se realizó una transferencia de Northern sobre ARN derivado de los xenoinjertos de LAPC y un panel de muestras de cáncer de próstata con su tejido de próstata adyacente normal relacionado. Los resultados muestran altos niveles de expresión de PHOR-1 en LAPC-4 AD, LAPC-9 AD y LAPC-9 AI. Se detecta una expresión menor en próstata normal y no se observa expresión en LAPC-4 AI (FIG. 8). El análisis de 4 parejas normales/tumorales relacionadas de especímenes clínicos obtenidos de pacientes con cáncer de próstata mostró la expresión de PHOR-1 en todas las muestras de pacientes (FIG. 8). Curiosamente, en 3 de las 4 parejas relacionadas, la expresión de PHOR-1 era 5-20 veces mayor en las muestras tumorales en comparación con el tejido adyacente normal relacionado. Estos resultados sugieren que el PHOR-1

específico de próstata está regulado positivamente en el cáncer y puede tener un papel funcional en la patología del cáncer de próstata.

Análisis de transferencia de Northern y puntual de muestras de pacientes tumorales/normales relacionadas

5 El análisis de transferencia de Northern y puntual mostró una regulación positiva de PHOR-1 en 8 de 10 tumores de cáncer de próstata (puntuaciones de Gleason de 6 a 9) en comparación con sus tejidos adyacentes normales (Figura 9A-B). Las transferencias puntuales usando ADNc amplificados derivados de pacientes (Clontech, CA) muestran regulación positiva de PHOR-1 en 3/3 pacientes con cáncer de próstata, 6/14 pacientes con cáncer de riñón, 2/8 cánceres uterinos, 1/1 cáncer de cuello uterino, 3/8 cánceres de estómago y en 7/7 pacientes con cáncer rectal (Figura 10).

10 *ARN in situ*

15 El análisis de ARN *in situ* usando una ribosonda antisentido de PHOR-1 mostró una expresión significativa en células basales y del epitelio glandular en próstata normal (4/4), PIN (1/1) y pacientes con cáncer de próstata (6/6). La ribosonda con sentido de PHOR-1 tenía de escasa a ninguna tinción. La tinción de ARN *in situ* en PIN y cáncer de próstata se muestra en la Figura 11A-B. La intensidad de tinción en las células cancerosas era generalmente superior a la observada en glándulas normales (Figura 12A-B). Los resultados de ARN *in situ* también demuestran que la expresión observada en los tejidos de próstata es en el epitelio glandular, células basales y células cancerosas.

Ejemplo 5: Expresión de proteína PHOR-1 recombinante en células bacterianas

Construcciones de pGEX

20 Para expresar PHOR-1 en células bacterianas, se fusionaron porciones de PHOR-1 al gen de la glutatión S-transferasa (GST) por clonación en pGEX-2T o pGEX-6P-1 (Amersham Pharmacia Biotech, NJ). Todas las construcciones se realizaron para generar secuencias proteicas de PHOR-1 recombinantes con GST fusionadas en el extremo N-terminal con o sin un epítipo de seis histidinas en el extremo C-terminal. El marcador epitópico de seis histidinas se generó por adición de los codones de histidina al cebador de clonación en el extremo 3' de la ORF. Un sitio de reconocimiento de trombina o PreScission TM permite la escisión del marcador GST de PHOR-1 o de las construcciones pGEX-2T y pGEX-6P-1, respectivamente. El gen de resistencia a ampicilina y el origen de pBR322 permiten la selección y el mantenimiento del plásmido en *E. coli*. Los siguientes fragmentos de PHOR-1 se clonaron en pGEX-6P-1:

30 Aminoácidos 128 a 238
Aminoácidos 188 a 317
Aminoácidos 100 a 295

El siguiente fragmento de PHOR-1 se clonó en pGEX-2T: Aminoácidos 86 a 310.

Pueden generarse construcciones adicionales en pGEX-6P-1 que abarcan las siguientes regiones de la proteína PHOR-1:

35 Aminoácidos 1 a 128
Aminoácidos 1 a 188
Aminoácidos 1 a 317
Aminoácidos 52 a 238.

Construcciones de pMAL

40 Para expresar PHOR-1 en células bacterianas, se fusionaron porciones de PHOR-1 al gen de proteína de unión a maltosa (MBP) por clonación en pMAL-c2X y pMAL-p2X (New England Biolabs, MA). Se prepararon todas las construcciones para generar secuencias proteicas de PHOR-1 recombinantes con MBP fusionada en el extremo N-terminal y un epítipo de seis histidinas en el extremo C-terminal. El marcador epitópico de seis histidinas se generó por adición de los codones de histidina al cebador de clonación 3'. Un sitio de reconocimiento de Factor Xa permite la escisión del marcador GST de PHOR-1. Los vectores pMAL-c2X y pMAL-p2X están optimizados para expresar la proteína recombinante en el citoplasma o periplasma, respectivamente. La expresión en periplasma potencia el plegamiento de proteínas con enlaces disulfuro. Los aminoácidos 86 a 310 de PHOR-1 se clonaron tanto en pMAL-c2X como en pMAL-p2X.

50 Pueden generarse construcciones adicionales en pMAL-c2X y pMAL-p2X que abarcan las regiones siguientes de la proteína PHOR-1:

Aminoácidos 1 a 128
Aminoácidos 1 a 188
Aminoácidos 1 a 317
Aminoácidos 52 a 238

Aminoácidos 100 a 295
 Aminoácidos 128 a 238
 Aminoácidos 188 a 317.

Ejemplo 6: Expresión de proteína PHOR-1 recombinante en sistemas de mamífero

5 *Construcción pcDNA4/HisMax-TOPO*

Para expresar PHOR-1 en células de mamífero, la ORF de PHOR-1 de 951 pb se clonó en pcDNA4/HisMax-TOPO Versión A (nº cat K864-20, Invitrogen, Carlsbad, CA). La expresión de proteína está dirigida por el promotor de citomegalovirus (CMV) y el potenciador de la traducción SP163. La proteína recombinante tiene epítomos Xpress™ y de seis histidinas fusionadas en el extremo N-terminal. El extremo C-terminal de la proteína recombinante tiene una fusión de 28 aminoácidos resultante de secuencias de vector antes del codón de terminación. El vector pcDNA4/HisMax-TOPO también contiene la señal de poliadenilación y la secuencia de terminación de la transcripción de la hormona de crecimiento bovina (BGH) para aumentar la estabilidad del ARNm junto con el origen de SV40 para replicación episomal y rescate de vector simple en líneas celulares que expresan el antígeno T grande. El gen de resistencia a zeocina permite la selección de células de mamífero que expresan la proteína y el gen de resistencia a ampicilina y el origen ColE1 permiten la selección y el mantenimiento del plásmido en *E. coli*.

Construcción pcDNA3.1/MycHis

Para expresar PHOR-1 en células de mamífero, la ORF de PHOR-1 de 951 pb se clonó en pcDNA3.1/MycHis Versión A (Invitrogen, Carlsbad, CA). La expresión de proteína está dirigida por el promotor de citomegalovirus (CMV). La proteína recombinante tiene el myc y seis histidinas fusionadas en el extremo C-terminal. El vector pcDNA3.1/MycHis también contiene la señal de poliadenilación y la secuencia de terminación de la transcripción de la hormona del crecimiento bovina (BGH) para aumentar la estabilidad del ARNm junto con el origen de SV40 para replicación episomal y rescate de vector simple en líneas celulares que expresan el antígeno T grande. El gen de resistencia a neomicina permite la selección de células de mamífero que expresan la proteína y el gen de resistencia a ampicilina y el origen ColE1 permiten la selección y el mantenimiento del plásmido en *E. coli*.

25 *Construcción pcDNA3.1CT-GFP-TOPO*

Para expresar PHOR-1 en células de mamífero y permitir la detección de la proteína recombinante usando fluorescencia, la ORF de 951 pb se clonó en pcDNA3.1CT-GFP-TOPO (Invitrogen, CA). La expresión de proteína está dirigida por el promotor de citomegalovirus (CMV). La proteína recombinante tiene la proteína verde fluorescente (GFP) fusionada al extremo C-terminal facilitando la detección *in vivo* no invasiva y los estudios de biología celular. El vector pcDNA3.1/MycHis también contiene la señal de poliadenilación y la secuencia de terminación de la transcripción de la hormona de crecimiento bovina (BGH) para aumentar la estabilidad del ARNm junto con el origen de SV40 para replicación episomal y rescate de vector simple en líneas celulares que expresan el antígeno T grande. El gen de resistencia a neomicina permite la selección de células de mamífero que expresan la proteína y el gen de resistencia a ampicilina y el origen ColE1 permiten la selección y el mantenimiento del plásmido en *E. coli*.

Puede realizarse una construcción adicional con una fusión con GFP N-terminal en pcDNA3.1NT-GFP-TOPO que abarca la longitud completa de la proteína PHOR-1.

Construcciones pSRα

Para generar líneas celulares de mamífero que expresen PHOR-1 de forma constitutiva, la ORF de 951 pb se clonó en construcciones pSRα y se generaron líneas celulares estables. Se generaron retrovirus anfitrópicos y ecotrópicos por transfección de construcciones pSRα en la línea de empaquetamiento 293T-10A1 o cotransfección de pSRα y un plásmido auxiliar (φ-) en células 293, respectivamente. El retrovirus puede usarse para infectar una diversidad de líneas celulares de mamífero, dando como resultado la integración del gen clonado, PHOR-1, en las líneas celulares huésped. La expresión de proteína está dirigida por una repetición terminal larga (LTR). El gen de resistencia a neomicina permite la selección de células de mamífero que expresen la proteína y el gen de resistencia a ampicilina y el origen ColE1 permite la selección y el mantenimiento del plásmido en *E. coli*. Se realizó una construcción pSRα adicional que fusionó el marcador FLAG al extremo C-terminal para permitir la detección usando anticuerpos anti-FLAG. La secuencia de FLAG 5'gat tac aag gat gac gac gat aag 3' (SEC ID Nº: 33) se añadió al cebador de clonación en el extremo 3' de la ORF.

Pueden realizarse construcciones pSRα adicionales para producir proteínas de fusión con GFP y myc/6 HIS tanto N-terminales como C-terminales de la proteína PHOR-1 de longitud completa.

Ejemplo 7: Producción de PHOR-1 recombinante en un sistema de baculovirus

Para generar una proteína PHOR-1 recombinante en un sistema de expresión de baculovirus el ADNc de PHOR-1 se clona en el vector de transferencia de baculovirus pBlueBac 4.5 (Invitrogen), que proporciona un marcador His en el extremo N-terminal. En concreto, el pBlueBac-PHOR-1 se cotransfecta con el plásmido auxiliar pBac-N-Blue

(Invitrogen) en células de insecto SF9 (*Spodoptera frugiperda*) para generar baculovirus recombinante (véase el manual de instrucciones de Invitrogen para detalles). Después se recoge el baculovirus del sobrenadante celular y se purifica por ensayo de placas.

- 5 Después se genera proteína PHOR-1 recombinante por infección de células de insecto HighFive (Invitrogen) con el baculovirus purificado. La proteína PHOR-1 recombinante puede detectarse usando un anticuerpo anti-PHOR-1. La proteína PHOR-1 puede purificarse y usarse en diversos ensayos basados en células o como inmunógeno para generar anticuerpos policlonales y monoclonales específicos para PHOR-1.

Ejemplo 8: Anticuerpos policlonales y monoclonales contra PHOR-1

- 10 Se obtuvieron tres inmunógenos para generar reactivos de anticuerpos que se unen específicamente a PHOR-1. Dos antígenos eran péptidos que codifican los aminoácidos 1-14 (MVDPNGNESSATYF; SEC ID N°: 8) y los aminoácidos 262-274 (VHRFSKRRDSPLP; SEC ID N°: 9) de la secuencia de la proteína PHOR-1. Se espera que estos péptidos codifiquen el extremo N-terminal extracelular y el bucle extracelular entre los supuestos 6° y 7° dominios transmembrana, respectivamente, de la proteína PHOR-1, que es el sitio de unión a ligando esperado. El tercer inmunógeno era una proteína de fusión con glutatión-S-transferasa (GST) que incluye los aminoácidos 86-310 de la secuencia de la proteína PHOR-1. Esta proteína de fusión se generó por amplificación mediada por PCR de los nucleótidos 388-1062 del clon de ADNc PHOR-1 con los cebadores siguientes (SEC ID N°: 34, 35, respectivamente):

CEBADOR 5' **CCGAATTCCATCTTCTGGTTCAATTC**

EcoRI

CEBADOR 3' **CCTCTCGAGTTCACATGGAAAAGTCGAAG**

XhoI

- 20 El producto resultante se clonó en los sitios de restricción EcoRI y XhoI del vector de fusión con GST pGEX-2T (Pharmacia). Se purificó proteína de fusión de GST-PHOR-1 recombinante a partir de bacterias inducidas por cromatografía de afinidad con glutatión-sepharose.

- 25 Además de los antígenos anteriores, otros péptidos y proteínas bacterianas y producidas por virus baculovirus que codifican otras regiones de la secuencia de la proteína PHOR-1 pueden usarse para generar reactivos de anticuerpos específicos de PHOR-1. Dichos reactivos pueden dirigirse a regiones de la proteína PHOR-1 que pueden modular la función de PHOR-1, tales como un anticuerpo que bloquee la unión a ligando. Dichos reactivos pueden usarse para elucidar la función y las rutas de transducción de señales de la proteína PHOR-1.

Generación de anticuerpos policlonales

- 30 Para generar sueros policlonales contra PHOR-1, la proteína de fusión con GST purificada y los péptidos acoplados a hemocianina de lapa californiana (KLH) se usaron para inmunizar a conejos individuales de la forma siguiente. Los conejos se inmunizaron con 200 µg de proteína de fusión o antígeno peptídico KLH mezclado en adyuvante completo de Freund. Después, los conejos se inyectaron cada dos semanas con 200 µg de inmunógeno en adyuvante incompleto de Freund. Se tomaron extracciones de sangre de ensayo aproximadamente 7-10 días después de cada inmunización. El título de cada antisuero de péptido era de al menos 1×10^5 según se determinó por ELISA para los inmunógenos respectivos. El título del suero de fusión con GST era de al menos 1×10^6 .

- 35 Los antisueros de péptidos se purificaron por afinidad por paso del suero sobre una columna de afinidad compuesta por el péptido respectivo acoplado covalentemente a una matriz Affigel (BioRad). El suero generado contra la fusión con GST se semipurifica primero por eliminación del anticuerpo reactivo con GST por paso sobre una columna de afinidad de GST. El anticuerpo específico de PHOR-1 se aísla después por paso sobre una columna de afinidad de GST-PHOR-1. Como alternativa, pueden aislarse antisueros específicos de PHOR-1 por cromatografía de afinidad usando una proteína de fusión de proteína de unión a maltosa (MBP)-PHOR-1 que codifica los mismos aminoácidos. El suero purificado por afinidad de conejos inmunizados con el péptido N-terminal de la secuencia de PHOR-1 inmunoprecipita proteína PHOR-1 a partir de lisados de células transfectadas con ADNc de PHOR-1 (Figura 13A-B) y detecta la expresión en superficie celular de proteína PHOR-1 por análisis citométrico de flujo de células transfectadas (Figura 14A-B).

- 45 *Generación de anticuerpos monoclonales murinos*

Para generar AcM contra PHOR-1, se inmunizaron ratones Balb C intraperitonealmente con 200 µg de proteína de fusión de GST-PHOR-1 mezclada en adyuvante completo de Freund. Después, los ratones se inmunizaron posteriormente cada 2-4 semanas con 200 µg de antígeno mezclado en adyuvante incompleto de Freund. Después de 3 inmunizaciones los títulos de las extracciones de sangre de ensayo de estos ratones eran de al menos $1,2 \times 10^6$

determinados por ELISA, y reconocían específicamente la secuencia de aminoácidos de PHOR-1 como se muestra por transferencia de Western usando una proteína de fusión con MBP que codifica los mismos aminoácidos presentes en la fusión con GST (Fig. 15). El análisis citométrico de flujo de células LNCaP y células de xenoinjerto de LAPC9 muestra un desplazamiento fluorescente cuando se tiñen con una combinación de extracciones de sangre de ratones inmunizados en comparación con sus sueros preinmunes afines, demostrando la detección en superficie celular de proteína PHOR-1 (Fig. 16A-B).

Una vez que se obtiene la reactividad y especificidad apropiadas según se determina por ELISA, transferencia de Western y análisis de citometría de flujo, se lleva a cabo entonces la fusión y la generación de hibridomas con procedimientos establecidos bien conocidos en la técnica (Harlow y Lane, 1988).

También pueden usarse estrategias de inmunización y antígenos alternativos para generar AcM con una reactividad y especificidad específicas contra diversas regiones de la proteína PHOR-1. Dichos antígenos pueden incluir péptidos adicionales y proteínas recombinantes producidas en bacterias o baculovirus que codifican diversas regiones de la secuencia de la proteína PHOR-1. También puede usarse una estrategia de inmunización basada en células en la que el ADNc de PHOR-1 se sobreexpresa en células tales como fibroblastos de ratón NIH3T3 o linfocitos B murinos 300.19, y células completas o preparaciones de membrana a partir de estas células se usan como inmunógeno.

Ejemplo 9: Caracterización de la expresión de proteína PHOR-1

Células 293T se transfectaron de forma transitoria con el plásmido de expresión pCDNA4 HIS/MAX (Invitrogen) en el que el ADNc de PHOR-1 está fusionado en el extremo amino-terminal con dos marcadores epitópicos, Express e His G. Células transfectadas con control de vector vacío y PHOR-1 se tiñeron con un AcM que reconoce específicamente el epítipo Express N-terminal o con un AcP de conejo dirigido contra los 14 aminoácidos N-terminales de la secuencia de PHOR-1. Como se muestra en la Figura 13A, y en las Figuras 14A-B, las células transfectadas con PHOR-1 demuestran un desplazamiento fluorescente específico en comparación con células de control con tanto los AcM anti-Express como los AcP. Este desplazamiento indica que PHOR-1 se expresa en la superficie celular con el extremo N-terminal expuesto hacia el exterior de la membrana plasmática, lo que concuerda con la topología de los receptores acoplados a proteína G conocidos. La expresión de PHOR-1 por estas células se confirmó adicionalmente por inmunohistoquímica (véase el ejemplo siguiente).

Los análisis de Western e inmunoprecipitación de proteína PHOR-1 marcada con epítipo de células transfectadas muestran una banda inmunorreactiva de 37 kD que coincide con el peso molecular esperado de la proteína PHOR-1 deducida a partir de la secuencia de aminoácidos (Figura 13B). Además, se observa una mancha inmunorreactiva de alto peso molecular en células transfectadas con PHOR-1 que puede representar agregados insolubles en SDS y calor de la proteína mediados por interacción hidrófoba de los 7 dominios transmembrana.

Se usó suero de ratones inmunizados con proteína GST-PHOR-1 para examinar la expresión de proteína PHOR-1 endógena. Células de cáncer de próstata LNCaP y LAPC9, expresando ambas ARNm de PHOR-1, presentan un desplazamiento de la fluorescencia cuando se tiñen con sueros inmunes en comparación con sueros preinmunes, demostrando la expresión en superficie celular de proteína PHOR-1 en estas poblaciones celulares (Fig. 16). Además, el ejemplo siguiente demuestra el uso de este suero para detectar la expresión endógena de PHOR-1 en próstata normal, cáncer de próstata y líneas celulares de cáncer de próstata.

La expresión de PHOR-1 se evaluó por traducción *in vitro* sin células. Se tradujo ADNc de control y ADNc de PHOR-1 *in vitro* usando lisados de reticulocitos de conejo de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Promega, Madison, WI). Los resultados del ensayo *in vitro* sin células se muestran en la Figura 17 y demuestran que el ADNc de PHOR-1 se traduce en una proteína de 38-42 kDa que corresponde al peso molecular calculado de PHOR-1.

Ejemplo 10: Detección inmunohistoquímica de PHOR-1 en próstata normal, cáncer de próstata y líneas celulares de cáncer de próstata

Procedimientos

Bloques de tejido fijados con formalina embebidos en parafina se seccionaron a 4 micrómetros y se pusieron sobre portaobjetos de microscopio Capillary Gap cargados positivamente (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ). Después de desparafinar en xileno, seguido de hidratación a través de una serie de alcohol, las secciones tisulares se pretrataron en un recipiente al vapor durante 20 minutos en presencia de citrato sódico (10 mM, pH 6,0), seguido de una incubación con proteinasa K (1:40) de 10 minutos para optimizar la reactividad del anticuerpo. Después de enfriar durante 5 minutos, los portaobjetos se inmunotiñeron usando una técnica de biotina-estreptavidina-peroxidasa. En resumen, los portaobjetos se incubaron en suero de bloqueo (cabra normal) durante 5 minutos, seguido de anticuerpo primario policlonal de conejo anti-PHOR-2 µg/ml 1 (25 minutos), anticuerpo secundario biotinilado de cabra anti-IgG de conejo (25 min), bloqueo con peroxidasa endógena (3 X 1,5 minutos) y complejo de estreptavidina conjugado con enzima peroxidasa, Vector Labs, Burlingame, CA (10 minutos). Entre cada incubación, las secciones se aclararon en tampón. Se usó cromógeno DAB —diaminobenzidina (QualTek Molecular Labs) para revelar la reacción— produciendo un precipitado marrón. Los portaobjetos se contratiñeron posteriormente con hematoxilina y se cubrieron con cubreobjetos.

Resultados

La expresión endógena de la proteína PHOR-1 se demuestra en el análisis de inmunohistoquímica del anticuerpo policlonal de conejo anti-PHOR-1 (PÉPTIDO 1: aminoácidos 1-14) (Figura 18A-F). La tinción en el cáncer de próstata es mayor que la tinción observada en próstata normal. La tinción se localiza apicalmente dentro del epitelio luminal de la próstata normal (Figuras 18E y 18F). La tinción observada en cáncer de próstata también se localiza apicalmente en el cáncer de grado de bajo a intermedio (Figuras 18B y 18C) y por todas las células del cáncer de próstata más avanzado (Figura 18A). La línea celular de cáncer de próstata, LNCaP, también muestra una tinción similar (Figuras 18D y 19F) en casi todas las células.

La especificidad del anticuerpo policlonal de conejo anti-PHOR-1 (PÉPTIDO 1) se demuestra en la Figura 19A-F. La línea celular obtenida por ingeniería genética 293T-PHOR-1 (Figura 19B) que expresa proteína PHOR-1 a partir de la construcción episomal pcDNA4 HIS/MAX, y la línea celular PC3-PHOR-1 (Figura 19D) que expresa PHOR-1 de forma estable a partir de una construcción pSR α integrada, muestran ambas una tinción marrón específica que no está presente en las líneas celulares parentales no modificadas por ingeniería genética (Figuras 19A y 19C, respectivamente). La tinción en la línea celular 293T-PHOR-1 (Figura 19B) es muy fuerte en un subconjunto de células, como se espera de una transfección transitoria con una construcción pcDNA4 HIS/MAX que dirige la expresión de PHOR-1 a partir de un promotor de CMV. Sin embargo, la tinción en la línea celular PC3-PHOR-1 (Figura 19D) está presente en todas las células observadas, como se espera en una línea celular estable.

Estos datos demuestran que el anticuerpo policlonal de conejo anti-PHOR-1 (PÉPTIDO 1) reconoce específicamente la proteína PHOR-1. Además, la tinción observada en PC3-PHOR-1 (Figura 19D) se parece mucho al patrón e intensidad de tinción observados en la línea celular de cáncer de próstata LNCaP (Figura 19F) y en cáncer de próstata (Figura 19E).

Ejemplo 11: Alteración de la fosforilación de tirosina y Erk por PHOR-1

Se cultivaron células PC3, que expresan de forma estable neo o PHOR-1 en el vector retroviral pSR α , en FBS al 1% durante una noche. Después, las células se dejaron sin tratar o se trataron con FBS al 10% durante 3 min. Las células se lisaron y se analizaron por transferencia de Western con AcM anti-fosfotirosina (UBI, Lake Placid, NY) (Figura 20A) o anti-fosfo-Erk (Cell Signal, Beverly, MA) (Figura 20B). El revestimiento de AcM anti-Grb2 (Transduction Laboratories, San Diego, CA) muestra una carga de proteína equivalente (Figura 20C). En la Figura 20D, la expresión de PHOR-1 se evaluó por transferencia de Northern (véase también la Figura 19D para una demostración inmunohistoquímica de la expresión de PHOR-1 por células PC3-PHOR-1). Se extrajo ARN a partir de células PC3-neo de control y células PC3 transducidas de forma estable con PHOR-1 y las transferencias de ARN se hibridaron usando la sonda PHOR-1 (fragmento Xba-EcoR1 del clon GTH10). Se usó ARN de xenoinjertos de LAPC4 como control positivo (Figura 20E). Los resultados muestran que el ARNm de PHOR-1 se expresa en células PC3-PHOR-1 transducidas con retrovirus pero no en células de control y que, una vez expresado, PHOR-1 altera el patrón de fosforilación de células PC3.

La fosforilación de tirosina desempeña un papel importante en la transmisión de acontecimientos de señalización de la superficie celular al núcleo. Además, se ha demostrado que la fosforilación de tirosina se produce a través de GPCR (Liebmann C, Bohmer FD. Curr Med. Chem. 2000, 7: 911 y Maudsley S, Pierce KL, Zamah AM, Miller WE, Ahn S, Daaka Y, Lefkowitz RJ, Luttrell LM. J. Biol. Chem. 2000, 275: 9572), y da como resultado la activación de cascadas de señalización que contribuyen al efecto del GPCR. Estos resultados (mostrados en la FIG. 20A-B) indican que, cuando se expresa PHOR-1 en células PC3, induce la fosforilación de tirosina de una proteína de 55 kDa y la desfosforilación de una proteína de 130 kDa. Además, la expresión de PHOR-1 induce un aumento de 2-3 veces en la fosforilación de Erk, una proteína asociada con la mitogénesis y la transformación (Greulich H, Erikson RL, J Biol Chem. 1998; 273: 13280), indicando que PHOR-1 activa la cascada de Erk.

Ejemplo 12: PHOR modula la concentración citoplasmática de AMPc

Se compararon células parentales y células que expresan PHOR-1 para determinar su capacidad para inducir la acumulación citoplasmática de AMPc. Se transfectaron células 293T con vector pcDNA4 HIS MAX vacío o con pcDNA4 HIS MAX PHOR-1. Las células se privaron de medio en suero bovino fetal al 1% (FBS) durante una noche y se incubaron con medio solamente o en presencia de FBS al 10%. Las células se lisaron y se analizaron para determinar el contenido de AMPc por inmunoensayo ligado a enzimas (EIA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Linco Research, St Charles, MI). Los resultados se muestran en la Tabla 1 e indican que la expresión de PHOR-1 altera la concentración de AMPc en respuesta a FBS.

Tabla 1

Muestra	AMPc, nM
293T + FBS	20,59
293T-PHOR-1 + FBS	43,08

(continuación)

Muestra	AMPC, nM
LAPC4 AD	46,12
LAPC4 AI	63,12

Todos los GPCR caracterizados, incluyendo los receptores olfatorios, funcionan activando la ruta del AMPc. En ausencia de ligando, los GPCR están normalmente en un estado inactivo. Tras la unión a ligando o la sobreexpresión, los GPCR adquieren una conformación activa y compleja con proteínas G. Esta interacción da como resultado la disociación de subunidades de proteína G y la activación de la adenilato ciclasa, dando como resultado la acumulación de AMPc (Bimbaumer L, Cell 1992, 71: 1069). La producción aumentada de AMPc da como resultado la activación de varias rutas de señalización aguas abajo que median el efecto de los GPCR. La demostración en este ejemplo de que la expresión de PHOR-1 en células 293T permite la acumulación de AMPc en respuesta a FBS indica que PHOR-1 funciona como un GPCR en estas condiciones.

Además, se determinó el contenido de AMPc para dos xenoinjertos de cáncer de próstata que difieren en su dependencia de andrógenos y su expresión de PHOR-1. El LAPC4AD es un xenoinjerto de cáncer de próstata dependiente de andrógenos que presenta una fuerte expresión de PHOR-1, según se pone de manifiesto por la transferencia de Northern mostrada en la Figura 20E. El contenido de AMPc de estas células, también mostrado en la Tabla anterior, era significativamente menor que el de las células LAPC4AI, que son independientes de andrógenos y no expresan PHOR-1.

Ejemplo 13: PHOR-1 induce el crecimiento de colonias en agar blando

Se analizaron células NIH-3T3 que expresaban de forma estable PHOR-1 para determinar su capacidad para formar colonias en agar blando. Las células NIH-3T3 que expresan de forma estable neo o Ras activado se usaron como controles negativos y positivos, respectivamente. El experimento se realizó por duplicado. El ensayo se evaluó 4 semanas después de la siembra en placas de las células. Los resultados se muestran en la Figura 21 y en la Tabla 2.

Tabla 2		
Número de colonias		
Células	Promedio	D. T.
3T3-Neo	39	12,7
3T3-PHOR	131	15,6
3T3-Ras	246	8,5

Los recuentos de colonias muestran que PHOR-1 induce un aumento de 3 veces en la formación de colonias respecto al control de neo. Este aumento significativo se ha observado en 2 experimentos separados. Estos resultados indican que la expresión de PHOR-1 en células NIH 3T3 induce un aumento de 3-4 veces en la formación de colonias en comparación con un aumento de 5 veces por el fuerte oncogén Ras, sugiriendo que PHOR-1 tiene capacidades de transformación significativas.

Ejemplo 14: Mapeo cromosómico del gen de PHOR-1

La localización cromosómica de PHOR-1 se determinó usando el panel de híbridos de radiación GeneBridge4 (Walter y col., 1994, Nat. Genetics 7: 22) (Research Genetics, Huntsville AL). Se usaron los siguientes cebadores de PCR para localizar a PHOR-1 (SEC ID N°: 31, 32, respectivamente):

101P3A11.1 ATCCTGACTAGGTTGTGGTTGGAG
101P3A11.2 TGTGGTTGGGAGTTCTAAAGAGGA

El vector de mapeo resultante para los 93 ADN del panel de híbridos de radiación era: 100000000100100001101000011110100010000201010100001100000001000011100001000000111101100001111

Este vector y el programa de mapeo en <http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/rhmapper.pl> localizaron a PHOR-1 en el telómero del cromosoma 11 en 11p15.5.

Debido a que el gen de PHOR-1 humano mapea en el cromosoma 11p15.5, pueden usarse polinucleótidos que codifican diferentes regiones de la proteína PHOR-1 para caracterizar anomalías citogenéticas en el cromosoma 11, banda p15.5 que se ha identificado que están asociados con diversos cánceres. En particular, se han identificado una diversidad de anomalías cromosómicas en 11p15.5 como anomalías citogenéticas frecuentes en varios cánceres diferentes (véase, por ejemplo, Lai y col., 2000, Clin. Cancer Res. 6(8): 3172-6; Oya y Schulz, 2000, Br. J. Cancer 83(5): 626-31; Svaren y col., 12 sept. 2000, J. Biol. Chem.). Por consiguiente, los polinucleótidos que codifican regiones específicas de la proteína PHOR-1 proporcionan nuevas herramientas que pueden usarse para definir con mayor precisión de la que anteriormente era posible, la naturaleza específica de las anomalías citogenéticas en esta región del cromosoma 11 que pueden contribuir al fenotipo maligno. En este contexto, estos polinucleótidos satisfacen la necesidad en la técnica de ampliar la sensibilidad de la exploración cromosómica para identificar anomalías cromosómicas más sutiles y menos comunes (véase, por ejemplo Evans y col., 1994, Am. J.

Obstet. Gynecol. 171(4): 1055-1057).

Ejemplo 11: Identificación de rutas de transducción de señales potenciales

Para determinar si PHOR-1 activa directa o indirectamente rutas de transducción de señales conocidas en células, se llevaron a cabo ensayos de indicador de transcripción basados en luciferasa (luc) en células que expresan PHOR-1. Estos indicadores de la transcripción contienen sitios de unión de consenso para factores de transcripción conocidos que se encuentran aguas abajo de rutas de transducción de señales bien caracterizadas. Los indicadores y ejemplos de sus factores de transcripción asociados, rutas de transducción de señales y estímulos de activación se enumeran a continuación.

1. NFkB-luc, NFkB/Rel; Ik-quinasa/SAPK; crecimiento/apoptosis/estrés
2. SRE-luc, SRF/TCF/ELK1; MAPK/SAPK; crecimiento/diferenciación
3. AP-1-luc, FOS/JUN; MAPK/SAPK/PKC; crecimiento/apoptosis/estrés
4. ARE-luc, receptor de andrógenos, esteroides/MAPK; crecimiento/diferenciación/apoptosis
5. p53-luc, p53; SAPK; crecimiento/diferenciación/apoptosis
6. CRE-luc, CREB/ATF2; PKA/p38; crecimiento/apoptosis/estrés

Los efectos mediados por PHOR-1 pueden ensayarse en células que muestran expresión de ARN. Pueden introducirse plásmidos indicadores de luciferasa por transfección mediada por lípidos (TFX-50, Promega). La actividad de luciferasa, un indicador de actividad transcripcional relativa, se mide por incubación de extractos celulares con el sustrato luciferina, y la luminiscencia de la reacción se controla en un luminómetro.

Ejemplo 16: Ensayos *in vitro* de la función de PHOR-1

La expresión de PHOR-1 en el cáncer de próstata proporciona pruebas de que este gen tiene un papel funcional en la progresión tumoral y/o el inicio de tumores. Es posible que PHOR-1 funcione como receptor implicado en la activación de señales de proliferación. La función de PHOR-1 puede evaluarse en células de mamífero usando estrategias *in vitro*. Para la expresión en mamíferos, PHOR-1 puede clonarse en varios vectores apropiados, incluyendo pcDNA 3.1 myc-His-tag y el vector retroviral pSR α tkneo (Muller y col., 1991, MCB 11: 1785). Usando dichos vectores de expresión, PHOR-1 puede expresarse en varias líneas celulares, incluyendo PC-3, NIH 3T3, LNCaP y 293T. La expresión de PHOR-1 puede controlarse usando anticuerpos anti-PHOR-1 y análisis de transferencia de Northern.

Las líneas celulares de mamífero que expresan PHOR-1 pueden ensayarse en varios ensayos *in vitro* e *in vivo*, incluyendo proliferación celular en cultivo de tejidos, activación de señales apoptóticas, formación de tumores en ratones SCID e invasión *in vitro* usando un sistema de cultivo de invasión de membrana (MICS; Welch y col., Int. J. Cancer 43: 449-457). El fenotipo de células PHOR-1 se compara con el fenotipo de células que carecen de expresión de PHOR-1.

Las líneas celulares que expresan PHOR-1 también pueden ensayarse para determinar la alteración de las propiedades invasivas y migratorias por medición del paso de células a través de una cámara de membrana porosa revestida con matrigel (Becton Dickinson). El paso de células a través de la membrana hacia el lado opuesto se controla usando un ensayo fluorescente (Becton Dickinson Technical Bulletin nº 428) usando células indicadoras cargadas con calceína-Am (Molecular Probes). Las líneas celulares analizadas incluyen células PC3, NIH 3T3 y LNCaP parentales y que sobreexpresan PHOR-1. Para determinar si las células que expresan PHOR-1 tienen propiedades quimioatrayentes, las células indicadoras se controlan para determinar su paso a través de la membrana porosa hacia un gradiente de medio acondicionado con PHOR-1 en comparación con medio de control. Este ensayo también puede usarse para calificar y cuantificar la neutralización específica del efecto inducido por PHOR-1 por composiciones terapéuticas de cáncer candidatas.

La función de PHOR-1 puede evaluarse usando tecnología de ARN antisentido acoplada a los diversos ensayos funcionales descritos anteriormente, por ejemplo, crecimiento, invasión y migración. Los oligonucleótidos de ARN antisentido pueden introducirse en células que expresan PHOR-1, impidiendo de este modo la expresión de PHOR-1. Las células que contienen control y antisentido pueden analizarse para determinar su potencial de proliferación, invasión, migración, apoptótico y transcripcional. El efecto local así como sistémico de la pérdida de la expresión de PHOR-1 pueden evaluarse.

Ejemplo 17: Ensayo *in vivo* para determinar la promoción del crecimiento de tumores con PHOR-1

El efecto de la proteína PHOR-1 sobre el crecimiento de células tumorales puede evaluarse *in vivo* por sobreexpresión del gen en ratones portadores de tumores. Por ejemplo, pueden inyectarse subcutáneamente ratones SCID en cada flanco con 1×10^6 de cada célula PC3, TSUPR1 o DU145 que contiene vector vacío tkNeo o PHOR-1. Pueden usarse al menos dos estrategias: (1) expresión de PHOR-1 constitutiva bajo la regulación de un promotor tal como un promotor constitutivo obtenido de los genomas de virus tales como virus polio, virus de la viruela aviar (documento UK 2.211.504 publicado el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como Adenovirus 2), papilomavirus bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus de los simios 40 (SV40), o por promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de

- inmunoglobulina, con tal de que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped, y (2) expresión regulada bajo el control de un sistema de vector inducible, tal como ecdisona, tet, etc., con tal de que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped. El volumen tumoral se controla después en el aspecto de tumores palpables y se sigue con el tiempo para determinar si las células que expresan PHOR-1 crecen a una velocidad más rápida y si los tumores producidos por células que expresan PHOR-1 demuestran características de agresividad alterada (por ejemplo, metástasis aumentada, vascularización, sensibilidad reducida a fármacos quimioterápicos). Además, a los ratones se les puede implantar 1×10^5 de las mismas células ortotópicamente para determinar si PHOR-1 tiene un efecto sobre el crecimiento local en la próstata o sobre la capacidad de las células para metastatizar, específicamente en pulmones, ganglios linfáticos y médula ósea.
- El ensayo también es útil para determinar el efecto inhibitorio de PHOR-1 de composiciones terapéuticas candidatas tales como, por ejemplo, intracuerpos de PHOR-1, moléculas antisentido de PHOR-1 y ribozimas.

Ejemplo 18: Clonación de genes de miembros de la familia de PHOR-1

- PHOR-1 es homólogo a una gran familia de receptores olfatorios que se expresan en el epitelio olfatorio y en neuronas. En un intento por identificar genes adicionales que sean homólogos a PHOR-1, la secuencia de la proteína PHOR-1 se usó como una sonda electrónica para identificar miembros de la familia en la base de datos pública de EST (etiqueta de secuencia de expresión) (dBest). Usando la función "tblastn" en el NCBI (National Center for Biotechnology Information) se realizó una consulta en la base de datos dBest con la secuencia de la proteína PHOR-1. Este análisis puso de manifiesto un nuevo miembro de la familia (FIG. 22). La EST A1138213 se aisló de una biblioteca de placenta humana y es homóloga a la región carboxilo-terminal de PHOR-1. Presenta una identidad del 49,5% con PHOR-1 a lo largo de un solapamiento de 95 aminoácidos. Este nuevo miembro de la familia se está analizando para determinar su expresión en muestras de próstata y cáncer de próstata y se clonará a partir de una genoteca de ADNc humano.

- Una estrategia alternativa para encontrar nuevos miembros de la familia es diseñar oligonucleótidos degenerados en regiones conservadas del gen (Raming y col., 1993, Nature 361: 353). Estos pueden usarse después en reacciones de RT-PCR sobre ADNc de primera cadena derivado de próstata o cáncer de próstata para aislar nuevos miembros de la familia de GPCR. Para aislar miembros de la familia de PHOR-1 usando RT-PCR, se seleccionaron las siguientes regiones conservadas para el diseño de oligonucleótidos: SLHEPMY (a.a. 56-62; SEC ID N°: 36), AMAFDY (a.a. 119-125; SEC ID N°: 37), YVAICHP (a.a. 125-131; SEC ID N°: 38), KAFGTCV (a.a. 37-243; SEC ID N°: 39) y GVKTKEL (a.a. 294-300; SEC ID N°: 40). Los oligonucleótidos degenerados usados son los siguientes:

- (1) para SLHEPMY: 1A-5'AGYCTNCAYSMNCCNATGTAY3' (SEC ID N°: 41),
1B-5'TCNCTNCAYSMNCCNATGTAY3' (SEC ID N°: 42),
1C-5'AGYTTRCAYSMNCCNATGTAY3' (SEC ID N°: 43),
1D-5'TCNTTRCAYSMNCCNATGTAY3' (SEC ID N°: 44);
- (2) para AMAFDY: 2A-5'GCNATGGCN'TTYGAYCGNTAY3' (SEC ID N°: 45),
2B-5'GCNATGGCN'TTYGAYAGRTAY3' (SEC ID N°: 46);
- (3) para YVAICHP: 3A-5'TAYGTNGCNATHTGYCAYCCN3' (con sentido) (SEC ID N°: 47),
3B-5'NGGRTGRCADATNGCNACRTA3' (antisentido) (SEC ID N°: 48);
- (4) para KAFGTCV: 4A-5'NACRCANGTNCRAANGCYTT3' (antisentido) (SEC ID N°: 49);
- (5) para GVKTKEL: 5A-5'DATYTSYTTNGTYTTNRCNCC3' (antisentido) (SEC ID N°: 50);

- donde (A) representa adenina, (C) citosina, (G) guanina, (T) timina, (R) adenina o guanina, (Y) citosina o timina, (S) citosina o guanina, (D) adenina o guanina o timina, (H) adenina o citosina o timina, (N) adenina o guanina o citosina o timina.

- La siguiente combinación de cebadores se usa para amplificar miembros de la familia a partir de ADNc de primera cadena: combinación de 1A-1D y 3B; combinación de 1A-1D y 4A; combinación de 1A-1D y 5A; combinación de 2A+2B y 4A; combinación de 2A+2B y 5A; 3A y 4A; 3A y 5A. Los productos de PCR resultantes se ligan después en el vector PCR2.1 (Invitrogen) y se transforman posteriormente en *E. coli* DH5. Después de la selección de azules/blancas y con ampicilina en agar, las colonias blancas resistentes a ampicilina se expandieron en un cultivo líquido para purificación de plásmido y secuenciación de insertos de ADNc. Las secuencias de estos clones se comparan con la secuencia de PHOR-1 y se realiza una consulta frente a bases de datos públicas y privadas disponibles. Las secuencias que representan nuevos miembros de la familia de PHOR-1 se eligen para un análisis adicional y clonación de longitud completa.

En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a:

1. Un polinucleótido que codifica un polipéptido de PHOR-1, en el que el polinucleótido se selecciona del grupo que consiste en:

- (a) un polinucleótido que tiene la secuencia que se muestra en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 1), en la que T también puede ser U;
- (b) un polinucleótido que tiene la secuencia que se muestra en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 1), del número de resto de nucleótido 133 al número de resto de nucleótido 1083, en el que T también puede ser U.
- (c) un polinucleótido que codifica un polipéptido de PHOR-1, cuya secuencia está codificada por el ADNc contenido en el plásmido denominado p101P3A11 depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo como N° de Acceso PTA-312;
- (d) un polinucleótido que codifica una proteína PHOR-1 que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2); y
- (e) un polinucleótido que es totalmente complementario a un polinucleótido de uno cualquiera de (a)-(d).
2. Un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una identidad de al menos el 90% con la secuencia de aminoácidos mostrada en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 2) a lo largo de su longitud completa.
3. Un fragmento de un polinucleótido de la realización 1, que comprende:
- (a) un polinucleótido que tiene la secuencia que se muestra en la FIG. 1A-D (SEC ID N°: 1), del número de resto de nucleótido 388 al número de resto de nucleótido 1062, del número de resto de nucleótido 159 al número de resto de nucleótido 733, del número de resto de nucleótido 854 al número de resto de nucleótido 3136 o del número de resto de nucleótido 133 al número de resto de nucleótido 1083;
- (b) un polinucleótido que es un fragmento del polinucleótido de (a) que tiene al menos 20 bases de nucleótidos de longitud; o
- (c) un polinucleótido que hibrida selectivamente en condiciones rigurosas con el polinucleótido de (a) o (b).
4. Un polinucleótido que codifica un polipéptido de PHOR-1, en el que el polipéptido incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en NESS (SEC ID N°: 10), NLTI (SEC ID N°: 11), NSTT (SEC ID N°: 12), RRDS (SEC ID N°: 13), SKR, SLHE (SEC ID N°: 14), SCID (SEC ID N°: 15), SGME (SEC ID N°: 16), GNESSA (SEC ID N°: 17), GLEEAQ (SEC ID N°: 18), GMESTV (SEC ID N°: 19), GTCVSH (SEC ID N°: 20), MVDPNGNESSATYF (SEC ID N°: 8), VHRFSKRSDPLP (SEC ID N°: 9), restos 112-128 de la SEC ID N°: 2, restos 1-128 de la SEC ID N°: 2, restos 128-238 de la SEC ID N°: 2, restos 188-317 de la SEC ID N°: 2, restos 100-295 de la SEC ID N°: 2, restos 1-188 de la SEC ID N°: 2, restos 52-238 de la SEC ID N°: 2, restos 61-82 de la SEC ID N°: 2, restos 239-254 de la SEC ID N°: 2 y restos 86-310 de la SEC ID N°: 2.
5. Un polinucleótido de la realización 1 que está marcado con un marcador detectable.
6. Un vector de expresión recombinante que contiene un polinucleótido de la realización 1.
7. Una célula huésped que contiene un vector de expresión de la realización 6.
8. Un procedimiento para producir un polipéptido de PHOR-1 que comprende cultivar una célula huésped de la realización 7 en condiciones suficientes para la producción del polipéptido.
9. El procedimiento de la realización 8, que comprende además recuperar el polipéptido de PHOR-1 producido de este modo.
10. Un polipéptido de PHOR-1 producido por el procedimiento de la realización 8.
11. Un polipéptido de PHOR-1 codificado por el polinucleótido de la realización 1.
12. Un polipéptido que comprende al menos 15 aminoácidos contiguos del polipéptido de la realización 11.
13. Un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente al polipéptido de PHOR-1 de la realización 11.
14. El anticuerpo o fragmento del mismo de la realización 13, que es monoclonal.
15. Una proteína recombinante que comprende la región de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal de la realización 14.
16. El anticuerpo o fragmento del mismo de la realización 13, que está marcado con un marcador detectable.
17. El anticuerpo o fragmento del mismo de la realización 16, en el que el marcador detectable se selecciona del grupo que consiste en un radioisótopo, compuesto fluorescente, compuesto bioluminiscente, compuesto quimioluminiscente, quelante de metales o enzima.
18. El fragmento de anticuerpo de la realización 13, que es un fragmento Fab, F(ab')₂, Fv o sFv.
19. El anticuerpo o fragmento del mismo de la realización 13, que es un anticuerpo humano.
20. El anticuerpo o fragmento del mismo de la realización 13, que está conjugado con una toxina o un agente

terapéutico.

21. El anticuerpo de la realización 13, que comprende restos de la región de unión a antígeno murina y restos de anticuerpo humano.

22. Un animal transgénico que produce un anticuerpo monoclonal de la realización 14.

5 23. Un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal de la realización 14.

24. Un anticuerpo monoclonal de cadena sencilla que comprende los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo monoclonal de la realización 14.

25. Un vector que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo monoclonal de cadena sencilla de la realización 24.

10 26. Un ensayo para detectar la presencia de una proteína PHOR-1 en una muestra biológica, que comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo o fragmento del mismo o proteína recombinante de la realización 16, y detectar la unión de proteína PHOR-1 en la muestra al mismo.

27. Un ensayo para detectar la presencia de un polinucleótido de PHOR-1 en una muestra biológica, que comprende:

15 (a) poner en contacto la muestra con una sonda polinucleotídica que hibride específicamente con el polinucleótido de la realización 1; y
(b) detectar la presencia de un complejo de hibridación formado por la hibridación de la sonda con el polinucleótido de PHOR-1 en la muestra, en el que la presencia del complejo de hibridación indica la presencia de un polinucleótido de PHOR-1 dentro de la muestra.

20 28. Un ensayo para detectar la presencia de ARNm de PHOR-1 en una muestra biológica, que comprende:

(a) producir ADNc a partir de la muestra por transcripción inversa usando al menos un cebador;
(b) amplificar el ADNc así producido usando polinucleótidos de PHOR-1 como cebadores con sentido y antisentido para amplificar ADNc de PHOR-1 en la misma;
(c) detectar la presencia del ADNc de PHOR-1 amplificado,

25 en el que los polinucleótidos de PHOR-1 usados como sondas con sentido y antisentido son capaces de amplificar el ADNc de PHOR-1 contenido dentro del plásmido p101P3A11 según se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo como N° de Acceso PTA-312.

30 29. Un procedimiento de detección de la presencia de un cáncer que expresa proteína PHOR-1, que comprende determinar el nivel de proteína PHOR-1 expresada por las células en una muestra de tejido de ensayo de un individuo y comparar el nivel determinado de este modo con el nivel de PHOR-1 expresada en una muestra normal correspondiente, proporcionando la presencia de proteína PHOR-1 elevada en la muestra de ensayo respecto a la muestra normal un indicio de la presencia de dicho cáncer en el individuo.

35 30. Un procedimiento de control de productos génicos de PHOR-1, que comprende determinar el estado de los productos génicos de PHOR-1 expresados por células en una muestra de tejido de ensayo de un individuo y comparar el estado determinado de este modo con el estado de productos génicos de PHOR-1 en una muestra normal correspondiente, proporcionando la presencia de productos génicos de PHOR-1 aberrantes en la muestra de ensayo respecto a la muestra normal un indicio de un crecimiento celular desregulado dentro del individuo.

31. Un procedimiento de diagnóstico de la presencia de cáncer en un individuo, que comprende:

40 (a) determinar el nivel de ARNm de PHOR-1 expresado en una muestra de ensayo obtenida del individuo; y
(b) comparar el nivel determinado de este modo con el nivel de ARNm de PHOR-1 expresado en una muestra de tejido normal conocida comparable;

proporcionando la presencia de una expresión de ARNm de PHOR-1 elevada en la muestra de ensayo respecto a la muestra de tejido normal un indicio de la presencia de cáncer.

45 32. Un procedimiento de diagnóstico de la presencia de cáncer en un individuo, que comprende:

(a) determinar el nivel de proteína PHOR-1 expresada en una muestra de ensayo obtenida del individuo; y
(b) comparar el nivel determinado de este modo con el nivel de proteína PHOR-1 expresada en una muestra de tejido normal conocida comparable,

50 proporcionando la presencia de proteína PHOR-1 elevada en la muestra de ensayo respecto a la muestra de tejido normal un indicio de la presencia de cáncer.

33. El procedimiento de la realización 31, en el que el cáncer es cáncer de próstata, riñón, uterino, cuello uterino, estómago o rectal, y las muestras de tejido de ensayo y normales se seleccionan del grupo que consiste en tejido de próstata, tejido de riñón, tejido uterino, espécimen de cuello uterino, tejido de estómago, tejido rectal, tejido óseo, tejido linfático, suero, sangre o semen.
- 5 34. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de PHOR-1 de la reivindicación de la realización 11 o una porción inmunogénica del mismo, y un vehículo fisiológicamente aceptable.
35. Una composición farmacéutica que comprende el vector de la realización 25, y un vehículo fisiológicamente aceptable.
- 10 36. Una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido antisentido complementario a o una ribozima capaz de escindir un polinucleótido de la realización 1, y un vehículo fisiológicamente aceptable.
37. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o fragmento del mismo de la realización 13 y un vehículo fisiológicamente aceptable.
- 15 38. Un procedimiento de tratamiento de un paciente con cáncer que expresa PHOR-1, que comprende administrar a dicho paciente un vector de acuerdo con la realización 25, de modo que el vector administre la secuencia codificante de anticuerpo monoclonal de cadena sencilla a las células cancerosas y el anticuerpo de cadena sencilla codificado se exprese intracelularmente en las mismas.
39. Un procedimiento de tratamiento de un paciente con cáncer que expresa PHOR-1, que comprende administrar a dicho paciente una composición de la realización 37.
- 20 40. Una composición de vacuna para el tratamiento de un cáncer que expresa PHOR-1, que comprende una porción inmunogénica de una proteína PHOR-1 y un vehículo fisiológicamente aceptable.
41. Un procedimiento de inhibición del desarrollo de un cáncer que expresa PHOR-1 en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de la composición de vacuna de la realización 40.
42. Un procedimiento de identificación de una molécula que module una actividad biológica de PHOR-1, que comprende:
- 25 (a) poner en contacto una molécula con una célula que exprese PHOR-1;
(b) ensayar una actividad biológica de PHOR-1 en presencia y ausencia de la molécula; y
(c) determinar si la actividad biológica de PHOR-1 se altera por la presencia de la molécula, siendo una alteración en la actividad biológica de PHOR-1 indicativa de una molécula que modula una actividad biológica de PHOR-1.
- 30 43. El procedimiento de la realización 42, en el que la actividad biológica de PHOR-1 comprende la fosforilación de tirosina, la acumulación de AMPc citosólico o la estimulación del crecimiento de colonias.

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> Arthur B. Raitano Daniel E.H. Afar Aya Jakobovits Mary Faris Rene S. Hubert Steve Chappell Mitchell Douglas C. Saffran
10	<120> Nuevo receptor acoplado a proteína G regulado positivamente en el cáncer de próstata y usos del mismo
	<130> 129.24WOU1
15	<150> 60/157.902 <151> 05-10-1999
	<160> 50
20	<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
	<210> 1 <211> 3136 <212> ADN
25	<213> Homo Sapiens
	<220> <221> CDS <222> (133) ... (1083)
30	<400> 1

```

cagagaggct gtatttcagt gcagcctgcc agacctcttc tggaggaaga ctggacaaag      60
ggggtcacac attccttcca tacgggttgag cctctacctg cctgggtgctg gtcacagttc      120
agcttcttca tg atg gtg gat ccc aat ggc aat gaa tcc agt gct aca tac      171
          1          5          10
ttc atc cta ata ggc ctc cct ggt tta gaa gag gct cag ttc tgg ttg      219
Phe Ile Leu Ile Gly Leu Pro Gly Leu Glu Glu Ala Gln Phe Trp Leu
          15          20          25
gcc ttc cca ttg tgc tcc ctc tac ctt att gct gtg cta ggt aac ttg      267
Ala Phe Pro Leu Cys Ser Leu Tyr Leu Ile Ala Val Leu Gly Asn Leu
          30          35          40          45
aca atc atc tac att gtg cgg act gag cac agc ctg cat gag ccc atg      315
Thr Ile Ile Tyr Ile Val Arg Thr Glu His Ser Leu His Glu Pro Met
          50          55          60
tat ata ttt ctt tgc atg ctt tca ggc att gac atc ctc atc tcc acc      363
Tyr Ile Phe Leu Cys Met Leu Ser Gly Ile Asp Ile Leu Ile Ser Thr
          65          70          75
tca tcc atg ccc aaa atg ctg gcc atc ttc tgg ttc aat tcc act acc      411
Ser Ser Met Pro Lys Met Leu Ala Ile Phe Trp Phe Asn Ser Thr Thr
          80          85          90
atc cag ttt gat gct tgt ctg cta cag att ttt gcc atc cac tcc tta      459
Ile Gln Phe Asp Ala Cys Leu Leu Gln Ile Phe Ala Ile His Ser Leu
          95          100          105

```

tct ggc atg gaa tcc aca gtg ctg ctg gcc atg gct ttt gac cgc tat Ser Gly Met Glu Ser Thr Val Leu Leu Ala Met Ala Phe Asp Arg Tyr 110 115 120 125	507
gtg gcc atc tgt cac cca ctg cgc cat gcc aca gta ctt acg ttg cct Val Ala Ile Cys His Pro Leu Arg His Ala Thr Val Leu Thr Leu Pro 130 135 140	555
cgt gtc acc aaa att ggt gtg gct gct gtg gtg cgg ggg gct gca ctg Arg Val Thr Lys Ile Gly Val Ala Ala Val Val Arg Gly Ala Ala Leu 145 150 155	603
atg gca ccc ctt cct gtc ttc atc aag cag ctg ccc ttc tgc cgc tcc Met Ala Pro Leu Pro Val Phe Ile Lys Gln Leu Pro Phe Cys Arg Ser 160 165 170	651
aat atc ctt tcc cat tcc tac tgc cta cac caa gat gtc atg aag ctg Asn Ile Leu Ser His Ser Tyr Cys Leu His Gln Asp Val Met Lys Leu 175 180 185	699
gcc tgt gat gat atc cgg gtc aat gtc gtc tat ggc ctt atc gtc atc Ala Cys Asp Asp Ile Arg Val Asn Val Val Tyr Gly Leu Ile Val Ile 190 195 200 205	747
atc tcc gcc att ggc ctg gac tca ctt ctc atc tcc ttc tca tat ctg Ile Ser Ala Ile Gly Leu Asp Ser Leu Leu Ile Ser Phe Ser Tyr Leu 210 215 220	795
ctt att ctt aag act gtg ttg ggc ttg aca cgt gaa gcc cag gcc aag Leu Ile Leu Lys Thr Val Leu Gly Leu Thr Arg Glu Ala Gln Ala Lys 225 230 235	843
gca ttt ggc act tgc gtc tct cat gtg tgt gct gtg ttc ata ttc tat Ala Phe Gly Thr Cys Val Ser His Val Cys Ala Val Phe Ile Phe Tyr 240 245 250	891
gta cct ttc att gga ttg tcc atg gtg cat cgc ttt agc aag cgg cgt Val Pro Phe Ile Gly Leu Ser Met Val His Arg Phe Ser Lys Arg Arg 255 260 265	939
gac tct ccg ctg ccc gtc atc ttg gcc aat atc tat ctg ctg gtt cct Asp Ser Pro Leu Pro Val Ile Leu Ala Asn Ile Tyr Leu Leu Val Pro 270 275 280 285	987
cct gtg ctc aac cca att gtc tat gga gtg aag aca aag gag att cga Pro Val Leu Asn Pro Ile Val Tyr Gly Val Lys Thr Lys Glu Ile Arg 290 295 300	1035
cag cgc atc ctt cga ctt ttc cat gtg gcc aca cac gct tca gag ccc Gln Arg Ile Leu Arg Leu Phe His Val Ala Thr His Ala Ser Glu Pro 305 310 315	1083
taggtgtcag tgatcaaact tcttttccat tcagagtcct ctgattcaga ttttaatggt aacatttttg aagacagtat tcagaaaaaa aatttcctta ataaaaaata caactcagat ccttcaaata tgaaactggg tggggaatct ccattttttc aatattatct tcttctttgt tttcttgcta catataatta ttaataccct gactaggttg tggttggagg gttattactt ttcattttac catgcagtcc aaatctaaac tgcttctact gatgggtttac agcattctga gataagaatg gtacatctag agaacatttg ccaaaggcct aagcacggca aaggaaaata aacacagaat ataataaaat gagataatct agcttaaaac tataacttcc tcttcagaac tcccaaccac attggatctc agaaaaatgc tgtcttcaaa atgacttcta cagagaagaa ataatttttc ctctggacac tagcacttaa ggggaagatt ggaagtaaaag ccttgaaaag agtacattta cctacgttaa tgaaagtga cacactgttc tgagagtttt cacagcatat ggaccctgtt tttcctatct aattttctta tcaacccttc aattaggcaa agatattatt agtaccctca ttgtagccat gggaaaattg atgttcagtg gggatcagtg aattaaatgg	1143 1203 1263 1323 1383 1443 1503 1563 1623 1683 1743 1803

ggcatacaaa	gtataaaaaat	taaaaaaaaaa	aaagacttca	tgcccaatct	catatgatgt	1863
ggaagaactg	ttagagagac	caacagggta	gtgggttaga	gatttccaga	gtcttacatt	1923
ttctagagga	ggtattttaat	ttcttctcac	tcatccagtg	ttgratttag	gaatttcctg	1983
gcaacagaa	tcatggcttt	aatcccacta	gctattgctt	attgtcctgg	tccaattgcc	2043
aattacctgt	gtcttggaag	aagtgatctc	taggttcacc	attatggaag	attcttattc	2103
agaaagctcg	catagggctt	atagcaagtt	atttattttt	aaaagttcca	taggtgattc	2163
tgataggcag	tgaggtttag	gagccaccag	ttatgatggg	aagtatggaa	tggcaggctc	2223
tgaagataac	attggccttt	tgagtgtgac	tcgtagctgg	aaagtgaggg	aatcttcagg	2283
accatgcttt	atttggggct	ttgtgcagta	tggaacaggg	actttgagac	caggaaagca	2343
atctgactta	ggcatgggaa	tcaggcattt	ttgcttctga	ggggctatta	ccaagggtta	2403
ataggtttca	tcttcaacag	gatatgacaa	cagtgttaac	caagaaactc	aaattacaaa	2463
tactaaaaa	tgtgatcata	tatgtggtaa	gtttcatttt	ctttttcaat	cctcagggtc	2523
cctgatatgg	attcctataa	catgctttca	tccccttttg	taatggatat	catatttggg	2583
aatgcctatt	taatacttgt	atttgctgct	ggactgtaag	cccatgaggg	cactgtttat	2643
tattgaatgt	catctctgtt	catcattgac	tgctctttgc	tcattcattga	atcccccagc	2703
aaagtgccta	gaacataata	gtgcttatgc	ttgacaccgg	ttatttttca	tcaaacctga	2763
ttccttctgt	cctgaacaca	tagccaggca	attttccagc	cttcttttgag	ttgggtatta	2823
ttaaattctg	gccattactt	ccaatgtgag	tggaaagtgc	atgtgcaatt	tctatacctg	2883
gctcataaaa	ccctcccatg	tgagcgcctt	catgttgaca	ttaaatgtga	cttgggaagc	2943
tatgtgttac	acagagtaaa	tcaccagaag	cctggatttc	tgaaaaaact	gtgcagagcc	3003
aaacctctgt	catttgcaac	tcccacttgt	atttgtacga	ggcagttgga	taagtgaaaa	3063
ataaagtact	atttgttcaa	gaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	3123
aaaaaaaaaa	aaa					3136

<210> 2
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 2

```

Met Val Asp Pro Asn Gly Asn Glu Ser Ser Ala Thr Tyr Phe Ile Leu
 1      5      10      15
Ile Gly Leu Pro Gly Leu Glu Glu Ala Gln Phe Trp Leu Ala Phe Pro
 20      25      30
Leu Cys Ser Leu Tyr Leu Ile Ala Val Leu Gly Asn Leu Thr Ile Ile
 35      40      45
Tyr Ile Val Arg Thr Glu His Ser Leu His Glu Pro Met Tyr Ile Phe
 50      55      60
Leu Cys Met Leu Ser Gly Ile Asp Ile Leu Ile Ser Thr Ser Ser Met
 65      70      75      80
Pro Lys Met Leu Ala Ile Phe Trp Phe Asn Ser Thr Thr Ile Gln Phe
 85      90      95
Asp Ala Cys Leu Leu Gln Ile Phe Ala Ile His Ser Leu Ser Gly Met
100      105      110
Glu Ser Thr Val Leu Leu Ala Met Ala Phe Asp Arg Tyr Val Ala Ile
115      120      125
Cys His Pro Leu Arg His Ala Thr Val Leu Thr Leu Pro Arg Val Thr
130      135      140
Lys Ile Gly Val Ala Ala Val Val Arg Gly Ala Ala Leu Met Ala Pro
145      150      155      160
Leu Pro Val Phe Ile Lys Gln Leu Pro Phe Cys Arg Ser Asn Ile Leu
165      170      175
Ser His Ser Tyr Cys Leu His Gln Asp Val Met Lys Leu Ala Cys Asp
180      185      190
Asp Ile Arg Val Asn Val Val Tyr Gly Leu Ile Val Ile Ile Ser Ala
195      200      205
Ile Gly Leu Asp Ser Leu Leu Ile Ser Phe Ser Tyr Leu Leu Ile Leu
210      215      220
Lys Thr Val Leu Gly Leu Thr Arg Glu Ala Gln Ala Lys Ala Phe Gly
225      230      235      240
Thr Cys Val Ser His Val Cys Ala Val Phe Ile Phe Tyr Val Pro Phe
245      250      255
Ile Gly Leu Ser Met Val His Arg Phe Ser Lys Arg Arg Asp Ser Pro
260      265      270

```

```

Leu Pro Val Ile Leu Ala Asn Ile Tyr Leu Leu Val Pro Pro Val Leu
275      280      285
Asn Pro Ile Val Tyr Gly Val Lys Thr Lys Glu Ile Arg Gln Arg Ile
290      295      300
Leu Arg Leu Phe His Val Ala Thr His Ala Ser Glu Pro
305      310      315

```

<210> 3
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> Proteína de rata

 <400> 3

```

Met Ser Ser Cys Asn Phe Thr His Ala Thr Phe Met Leu Ile Gly Ile
 1      5      10      15
Pro Gly Leu Glu Glu Ala His Phe Trp Phe Gly Phe Pro Leu Leu Ser
      20      25      30
Met Tyr Ala Val Ala Leu Phe Gly Asn Cys Ile Val Val Phe Ile Val
      35      40      45
Arg Thr Glu Arg Ser Leu His Ala Pro Met Tyr Leu Phe Leu Cys Met
      50      55      60
Leu Ala Ala Ile Asp Leu Ala Leu Ser Thr Ser Thr Met Pro Lys Ile
      65      70      75      80
Leu Ala Leu Phe Trp Phe Asp Ser Arg Glu Ile Thr Phe Asp Ala Cys
      85      90      95
Leu Ala Gln Met Phe Phe Ile His Ala Leu Ser Ala Ile Glu Ser Thr
      100      105      110
Ile Leu Leu Ala Met Ala Phe Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys His Pro
      115      120      125
Leu Arg His Ala Ala Val Leu Asn Asn Thr Val Thr Val Gln Ile Gly
      130      135      140
Met Val Ala Leu Val Arg Gly Ser Leu Phe Phe Phe Pro Leu Pro Leu
      145      150      155      160
Leu Ile Lys Arg Leu Ala Phe Cys His Ser Asn Val Leu Ser His Ser
      165      170      175
Tyr Cys Val His Gln Asp Val Met Lys Leu Ala Tyr Thr Asp Thr Leu
      180      185      190
Pro Asn Val Val Tyr Gly Leu Thr Ala Ile Leu Leu Val Met Gly Val
      195      200      205
Asp Val Met Phe Ile Ser Leu Ser Tyr Phe Leu Ile Ile Arg Ala Val
      210      215      220
Leu Gln Leu Pro Ser Lys Ser Glu Arg Ala Lys Ala Phe Gly Thr Cys
      225      230      235      240
Val Ser His Ile Gly Val Val Leu Ala Phe Tyr Val Pro Leu Ile Gly
      245      250      255
Leu Ser Val Val His Arg Phe Gly Asn Ser Leu Asp Pro Ile Val His
      260      265      270
Val Leu Met Gly Asp Val Tyr Leu Leu Leu Pro Pro Val Ile Asn Pro
      275      280      285
Ile Ile Tyr Gly Ala Lys Thr Lys Gln Ile Arg Thr Arg Val Leu Ala
      290      295      300
Met Phe Lys Ile Ser Cys Asp Lys Asp Ile Glu Ala Gly Gly Asn Thr
      305      310      315      320

```

<210> 4
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 4

```

Met Ser Ser Cys Asn Phe Thr His Ala Thr Cys Val Leu Ile Gly Ile
 1      5      10      15
Pro Gly Leu Glu Lys Ala His Phe Trp Val Gly Phe Pro Leu Leu Ser
      20      25      30

```

ES 2 371 212 T3

```

Met Tyr Val Val Ala Met Cys Gly Asn Cys Ile Val Val Phe Ile Val
  35                                40                                45
Arg Thr Glu Arg Ser Leu His Ala Pro Met Tyr Leu Phe Leu Cys Met
  50                                55                                60
Leu Ala Ala Ile Asp Leu Ala Leu Ser Thr Ser Thr Met Pro Lys Ile
  65                                70                                75                                80
Leu Ala Leu Phe Trp Phe Asp Ser Arg Glu Ile Ser Ile Glu Ala Cys
                                85                                90                                95
Leu Thr Gln Met Phe Phe Ile His Ala Leu Ser Ala Ile Glu Ser Thr
                                100                                105                                110
Ile Leu Leu Ala Met Ala Phe Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys His Pro
  115                                120                                125
Leu Arg His Ala Ala Val Leu Asn Asn Thr Val Thr Ala Gln Ile Gly
  130                                135                                140
Ile Val Ala Val Val Arg Gly Ser Leu Phe Phe Phe Pro Leu Pro Leu
  145                                150                                155                                160
Leu Ile Lys Arg Leu Ala Phe Cys His Ser Asn Val Leu Ser His Ser
                                165                                170                                175
Tyr Cys Val His Gln Asp Val Met Lys Leu Ala Tyr Ala Asp Thr Leu
                                180                                185                                190
Pro Asn Val Val Tyr Gly Leu Thr Ala Ile Leu Leu Val Met Gly Val
  195                                200                                205
Asp Val Met Phe Ile Ser Leu Ser Tyr Phe Leu Ile Ile Arg Thr Val
  210                                215                                220
Leu Gln Leu Pro Ser Lys Ser Glu Arg Ala Lys Ala Phe Gly Thr Cys
  225                                230                                235                                240
Val Ser His Ile Gly Val Val Leu Ala Phe Tyr Val Pro Leu Ile Gly
                                245                                250                                255
Leu Ser Val Val His Arg Phe Gly Asn Ser Leu His Pro Ile Val Arg
                                260                                265                                270
Val Val Met Gly Asp Ile Tyr Leu Leu Leu Pro Pro Val Ile Asn Pro
  275                                280                                285
Ile Ile Tyr Gly Ala Lys Thr Lys Gln Ile Arg Thr Arg Val Leu Ala
  290                                295                                300
Met Phe Lys Ile Ser Cys Asp Lys Asp Leu Gln Ala Val Gly Gly Lys
  305                                310                                315                                320

```

<210> 5
 <211> 427
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

<400> 5

```

gatcaaaactt cttttccatt cagagtcctc tgattcagat tttaatgtta acattttgga      60
agacagtatt cagaaaaaaaa atttccttaa taaaaataca actcagatcc ttcaaatatg      120
aaactgggtg gggaatctcc attttttcaa tattattttc ttctttgttt tcttgctacg      180
tataattatt aatatcctga ctagggtgtg gttggagggt tattactttt cattttacca      240
tgcagtccaa atctaaactg cttctactga tggtttacag cattctgaga taagaatggt      300
acatctagag aacatttgcc aaaggcctaa gcacagcaaa ggaaaataaa cacagaatat      360
aataaaatga gataatctag cttaaaacta taacttcctc tttagaactc ccaaccacat      420
ttggatc                                          427

```

<210> 6
 <211> 501
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(501)

<400> 6

gct gtg gcc atg ttt att gga gtg ttg gat cta ttc ttt atc atc cta																48
Ala Val Ala Met Phe Ile Gly Val Leu Asp Leu Phe Phe Ile Ile Leu																
1		5		10		15										
tct	tat	atc	ttt	atc	ctt	cag	gca	ggt	cta	caa	ctc	tcc	tct	cag	gag	96
Ser	Tyr	Ile	Phe	Ile	Leu	Gln	Ala	Val	Leu	Gln	Leu	Ser	Ser	Gln	Glu	
			20					25					30			
gcc	cgc	tac	aaa	gca	ttt	ggg	aca	tgt	gtc	tct	cac	ata	ggg	gcc	atc	144
Ala	Arg	Tyr	Lys	Ala	Phe	Gly	Thr	Cys	Val	Ser	His	Ile	Gly	Ala	Ile	
		35				40						45				
tta	gcc	ttc	tac	aca	cct	tca	gtc	atc	tct	tca	gtc	atg	cac	cgt	gtg	192
Leu	Ala	Phe	Tyr	Thr	Pro	Ser	Val	Ile	Ser	Ser	Val	Met	His	Arg	Val	
	50					55					60					
gcc	cgc	tgt	gct	gtg	cca	cac	gtc	cac	att	ctc	ctc	gcc	aat	ttc	tat	240
Ala	Arg	Cys	Ala	Val	Pro	His	Val	His	Ile	Leu	Leu	Ala	Asn	Phe	Tyr	
	65				70					75					80	
ctg	ctc	ttc	cca	ccc	atg	gtc	aat	ccc	atc	atc	tat	ggc	gtt	aag	acc	288
Leu	Leu	Phe	Pro	Pro	Met	Val	Asn	Pro	Ile	Ile	Tyr	Gly	Val	Lys	Thr	
			85					90						95		
aag	cag	atc	cgt	gac	agt	ctt	ggg	agt	att	cct	gag	aaa	gga	tgt	gtg	336
Lys	Gln	Ile	Arg	Asp	Ser	Leu	Gly	Ser	Ile	Pro	Glu	Lys	Gly	Cys	Val	
			100					105					110			
aat	aga	gag	tga	gga	ata	agt	gga	aaa	aga	gtg	ggg	ccc	agt	gaa	tgc	384
Asn	Arg	Glu	*	Gly	Ile	Ser	Gly	Lys	Arg	Val	Gly	Pro	Ser	Glu	Cys	
		115						120					125			
tgt	agt	ggg	cca	ggg	ctg	tgc	tga	gag	tag	atg	ggg	cct	aga	ctc	cac	432
Cys	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Cys	*	Glu	*	Met	Gly	Pro	Arg	Leu	His	
		130						135						140		
gtt	tag	ttc	ttt	tct	tgt	att	atg	aaa	aga	ata	aat	gat	gtc	ctg	aag	480
Val	*	Phe	Phe	Ser	Cys	Ile	Met	Lys	Arg	Ile	Asn	Asp	Val	Leu	Lys	
				145				150						155		
ctc	aga	aaa	aaa	aaa	aaa	aaa	aaa									501
Leu	Arg	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys									
				160												

<210> 7
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 7

ES 2 371 212 T3

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

115 120 125
 Ser Gly Pro Gly Leu Cys Glu Met Gly Pro Arg Leu His Val Phe Phe
 130 135 140
 Ser Cys Ile Met Lys Arg Ile Asn Asp Val Leu Lys Leu Arg Lys Lys
 145 150 155 160
 Lys Lys Lys

<210> 8
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 8

Met Val Asp Pro Asn Gly Asn Glu Ser Ser Ala Thr Tyr Phe
 1 5 10

<210> 9
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 9

Val His Arg Phe Ser Lys Arg Arg Asp Ser Pro Leu Pro
 1 5 10

<210> 10
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 10

Asn Glu Ser Ser
 1

<210> 11
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 11

ES 2 371 212 T3

		Asn Leu Thr Ile 1
5	<210> 12 <211> 4 <212> PRT <213> Homo Sapiens <400> 12	
10		Asn Ser Thr Thr 1
15	<210> 13 <211> 4 <212> PRT <213> Homo Sapiens <400> 13	
20		Arg Arg Asp Ser 1
25	<210> 14 <211> 4 <212> PRT <213> Homo Sapiens <400> 14	
30		Ser Leu His Glu 1
35	<210> 15 <211> 4 <212> PRT <213> Homo Sapiens <400> 15	
40		Ser Gly Ile Asp 1
45	<210> 16 <211> 4 <212> PRT <213> Homo Sapiens <400> 16	
50		Ser Gly Met Glu 1
55	<210> 17 <211> 6 <212> PRT <213> Homo Sapiens <400> 17	
		Gly Asn Glu Ser Ser Ala 1 5

ES 2 371 212 T3

5	<210> 18 <211> 6 <212> PRT <213> Homo Sapiens <400> 18	Gly 1	Leu 5	Glu 5	Glu 5	Ala 5	Gln 5
10	<210> 19 <211> 6 <212> PRT <213> Homo Sapiens <400> 19	Gly 1	Met 5	Glu 5	Ser 5	Thr 5	Val 5
20	<210> 20 <211> 6 <212> PRT <213> Homo Sapiens <400> 20	Gly 1	Thr 5	Cys 5	Val 5	Ser 5	His 5
30	<210> 21 <211> 14 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador <400> 21 ttttgatcaa gctt 14						
40	<210> 22 <211> 42 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador <400> 22 ctaatagcgc tcaactatagg gctcgagcgg ccgcccggggc ag 42						
50	<210> 23 <211> 12 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador <400> 23 ggcccgtcct ag 12						
60	<210> 24 <211> 40						

ES 2 371 212 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Cebador

 <400> 24
 gtaatacgac tcactatagg gcagcgtggt cgcggccgag 40

 10 <210> 25
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Cebador

 <400> 25
 20 cggctcctag 10

 <210> 26
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 26
 30 ctaatacgac tcactatagg gc 22

 <210> 27
 <211> 22
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 27
 40 tcgagcggcc gcccgggcag ga 22

 <210> 28
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 50
 <400> 28
 agcgtggtcg cggccgagga 20

 <210> 29
 55 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> Cebador

 <400> 29
 atatcgccgc gctcgtcgtc gacaa 25

	<210> 30	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador	
10	<400> 30	
	agccacacgc agctcattgt agaagg	26
	<210> 31	
	<211> 24	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
20	<400> 31	
	atcctgacta ggtgtggtt ggag	24
	<210> 32	
	<211> 24	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador	
30	<400> 32	
	tgtggtggg agttctaaag agga	24
	<210> 33	
35	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Marcador FLAG	
40	<400> 33	
	gattacaagg atgacgacga taag	24
	<210> 34	
45	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Cebador	
	<400> 34	
	ccgaattcca tttctggtt caatttc	27
55	<210> 35	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Cebador	
	<400> 35	
	cctctcgagt tcacatggaa aagtcgaag	29

ES 2 371 212 T3

5 <210> 36
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 36
 Ser Leu His Glu Pro Met Tyr
 1 5
 10 <210> 37
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 15 <400> 37
 Ala Met Ala Phe Asp Arg Tyr
 1 5
 20 <210> 38
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 25 <400> 38
 Tyr Val Ala Ile Cys His Pro
 1 5
 30 <210> 39
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 35 <400> 39
 Lys Ala Phe Gly Thr Cys Val
 1 5
 40 <210> 40
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 40
 Gly Val Lys Thr Lys Glu Ile
 1 5
 45 <210> 41
 <211> 21
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador
 55 <221> misc_feature
 <222> (11) ... (21)
 <223> n = A, T, C o G
 <400> 41

	agycnncays mncnatgta y	21
5	<210> 42 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador	
15	<221> misc_feature <222> (1)...(21) <223> n = A, T, C o G	
	<400> 42	21
	tcnctncays mncnatgta y	
20	<210> 43 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador	
	<221> misc_feature <222> (1) ... (21) <223> n = A, T ,C o G	
30	<400> 43	21
	agyttrcays mncnatgta y	
35	<210> 44 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador	
	<221> misc_feature <222> (1) ... (21) <223> n = A, T, C o G	
45	<400> 44	21
	tcnttrcays mncnatgta y	
50	<210> 45 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador	
	<221> misc_feature <222> (1)...(21) <223> n = A, T, C o G	
60	<400> 45	21
	gcnatggcnt tygaycgnta y	
65	<210> 46 <211> 21 <212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Cebador	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) ... (21)	
	<223> n = A, T, C o G	
10	<400> 46 gcnatggcnt tygayagrt a y	21
	<210> 47	
	<211> 21	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)...(21)	
	<223> n = A, T, C o G	
25	<400> 47 taygtngcna thtgyccaycc n	21
	<210> 48	
	<211> 21	
30	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Cebador	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) ... (21)	
	<223> n = A, T, C o G	
40	<400> 48 nggrtgrcad atngcnacrt a	21
	<210> 49	
	<211> 21	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> Cebador	
	<221> misc_feature	
	<222> (1) ... (21)	
	<223> n = A, T, C o G	
55	<400> 49 nacrcangtn ccraangcyt t	21
	<210> 50	
	<211> 21	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Cebador	

	<221> misc_feature	
	<222> (1) ... (21)	
	<223> n = A, T, C o G	
5	<400> 50	
	datytsytn gtyttnrcnc c	21

REIVINDICACIONES

1. Uso de un ARNm seleccionado del grupo que consiste en:
 - (a) el que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1;
 - (b) el que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1 del número de resto de nucleótido 133 al número de resto de nucleótido 1083; y
 - (c) el que tiene la secuencia de nucleótidos del polinucleótido codificante contenido en el plásmido denominado p101P3A11 depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo como N° de Acceso PTA-312;como un marcador para cáncer de próstata, riñón, útero, cuello de útero, estómago o rectal, en un procedimiento para detectar dicho cáncer.
2. El uso de la reivindicación 1, en el que el cáncer es cáncer de próstata.
3. El uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho procedimiento emplea una sonda que se une específicamente al ARNm definido en la reivindicación 1.
4. El uso de la reivindicación 3, en el que el cáncer es cáncer de próstata.
5. El uso de la reivindicación 3 ó 4, en el que la sonda está marcada con un marcador detectable.
6. El uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que el procedimiento comprende producir ADNc a partir de una muestra por transcripción inversa usando al menos un cebador y amplificar el ADNc así producido.
7. El uso de la reivindicación 6, en el que dicha amplificación emplea cebadores con sentido y antisentido.
8. Un vector que comprende un ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:
 - (a) la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1;
 - (b) la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N°: 1 del número de resto de nucleótido 133 al número de resto de nucleótido 1083; y
 - (c) el polinucleótido contenido en el plásmido denominado p101P3A11 depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo como N° de Acceso PTA-312;para su uso en el tratamiento de cáncer de próstata, riñón, útero, cuello de útero, estómago o rectal.
9. El uso de la reivindicación 8, en el que el vector es un vector viral.
10. El uso de la reivindicación 8 ó 9, en el que el cáncer es cáncer de próstata.

FIG. 1A

5'	CAG	AGA	GGC	TGT	ATT	TCA	GTG	CAG	CCT	GCC	AGA	CCT	CTT	CTG	GAG	GAA	GAC	TGG
			63			72			81			90			99			108
	ACA	AAG	GGG	GTC	ACA	CAT	TCC	TTC	CAT	ACG	GTT	GAG	CCT	CTA	CCT	GCC	TGG	TGC
			117			126			135			144			153			162
	TGG	TCA	CAG	TTC	AGC	TTC	TTC	ATG	ATG	GTG	GAT	CCC	AAT	GGC	AAT	GAA	TCC	AGT
								M	M	V	D	P	N	G	N	E	S	S
			171			180			189			198			207			216
	GCT	ACA	TAC	TTC	ATC	CTA	ATA	GGC	CTC	CCT	GGT	TTA	GAA	GAG	GCT	CAG	TTC	TGG
	A	T	Y	F	I	L	I	G	L	P	G	L	E	E	A	Q	P	W
			225			234			243			252			261			270
	TTG	GCC	TTC	CCA	TTG	TGC	TCC	CTC	TAC	CTT	ATT	GCT	GTG	CTA	GGT	AAC	TTG	ACA
	L	A	F	P	L	C	S	L	Y	L	I	A	V	L	G	N	L	T
			279			288			297			306			315			324
	ATC	ATC	TAC	ATT	GTG	CGG	ACT	GAG	CAC	AGC	CTG	CAT	GAG	CCC	ATG	TAT	ATA	TTT
	I	I	Y	I	V		R	T	E	H	S	L	H	E	P	M	Y	I
			333			342			351			360			369			378
	CTT	TGC	ATG	CTT	TCA	GGC	ATT	GAC	ATC	CTC	ATC	TCC	ACC	TCA	TCC	ATG	CCC	AAA
	L	C	M	L	S	G	I	D	I	L	I	S	T	S	S	M	P	K
			387			396			405			414			423			432
	ATG	CTG	GCC	ATC	TTC	TGG	TTC	AAT	TCC	ACT	ACC	ATC	CAG	TTT	GAT	GCT	TGT	CTG
	M	L	A		I	F	W	F	N	S	T	T	I	Q	P	D	A	C
			441			450			459			468			477			486
	CTA	CAG	ATT	TTT	GCC	ATC	CAC	TCC	TTA	TCT	GGC	ATG	GAA	TCC	ACA	GTG	CTG	CTG
	L	Q	I	F	A	I	H	S	L	S	G	M	E	S	T	V	L	L
			495			504			513			522			531			540
	GCC	ATG	GCT	TTT	GAC	CGC	TAT	GTG	GCC	ATC	TGT	CAC	CCA	CTG	CGC	CAT	GCC	ACA
	A	M	A	F		D	R	Y	V	A	I	C	H	P	L	R	H	A
			549			558			567			576			585			594
	GTA	CTT	ACG	TTG	CCT	CGT	GTC	ACC	AAA	ATT	GGT	GTG	GCT	GCT	GTG	GTG	CGG	GGG
	V	L	T	L	P	R	V	T	K	I	G	V	A	A	V	V	R	G

FIG. 1B

603	612	621	630	639	648
GCT GCA CTG ATG GCA	CCC CTT CCT	GTC TTC ATC	AAG CAG CTG	CCC TTC TGC	CGC

A A L M	A P L P	V F I K	Q L P F	C R	

657	666	675	684	693	702
TCC AAT ATC CTT TCC	CAT TCC TAC TGC	CTA CAC CAA GAT	GTC ATG AAG CTG	GCC	

S N I L	S H S Y	C L H Q	D V M K	L A	

711	720	729	738	747	756
TGT GAT GAT ATC CGG	GTC AAT GTC GTC	TAT GGC CTT ATC	GTC ATC ATC TCC	GCC	

C D D I	R V N V	V Y G L	I V I I	S A	

765	774	783	792	801	810
ATT GGC CTG GAC TCA	CTT CTC ATC TCC	TTC TCA TAT CTG	CTT ATT CTT AAG	ACT	

I G L D	S L L I	S F S Y	L L I L	K T	

819	828	837	846	855	864
GTG TTG GGC TTG ACA	CGT GAA GCC CAG	GCC AAG GCA TTT	GGC ACT TGC GTC	TCT	

V L G L	T R E A	Q A K A	F G T C	V S	

873	882	891	900	909	918
CAT GTG TGT GCT GTG	TTC ATA TTC TAT	GTA CCT TTC ATT	GGA TTG TCC ATG	GTG	

H V C A	V F I F	Y V P F	I G L S	M V	

927	936	945	954	963	972
CAT CGC TTT AGC AAG	CGG CGT GAC TCT	CCG CTG CCC GTC	ATC TTG GCC AAT	ATC	

H R F S	K R R D	S P L P	V I L A	N I	

981	990	999	1008	1017	1026
TAT CTG CTG GTT CCT	CCT GTG CTC AAC	CCA ATT GTC TAT	GGA GTG AAG ACA	AAG	

Y L L V	P P V L	N P I V	Y G V	K T K	

1035	1044	1053	1062	1071	1080
GAG ATT CGA CAG CGC	ATC CTT CGA CTT	TTC CAT GTG GCC	ACA CAC GCT TCA	GAG	

E I R Q	R I L R	L F H V	A T H A	S E	

1089	1098	1107	1116	1125	1134
CCC TAG GTG TCA GTG	ATC AAA CTT CTT	TTC CAT TCA GAG	TCC TCT GAT TCA	GAT	

P *					

1143	1152	1161	1170	1179	1188
TTT AAT GTT AAC ATT	TTG GAA GAC AGT	ATT CAG AAA AAA	AAT TTC CTT AAT	AAA	

FIG. 1C

1197	1206	1215	1224	1233	1242
AAA TAC AAC TCA GAT CCT TCA AAT ATG AAA CTG GTT GGG GAA TCT CCA TTT TTT					

1251	1260	1269	1278	1287	1296
CAA TAT TAT TTT CTT CTT TGT TTT CTT GCT ACA TAT AAT TAT TAA TAC CCT GAC					

1305	1314	1323	1332	1341	1350
TAG GTT GTG GTT GGA GGG TTA TTA CTT TTC ATT TTA CCA TGC AGT CCA AAT CTA					

1359	1368	1377	1386	1395	1404
AAC TGC TTC TAC TGA TGG TTT ACA GCA TTC TGA GAT AAG AAT GGT ACA TCT AGA					

1413	1422	1431	1440	1449	1458
GAA CAT TTG CCA AAG GCC TAA GCA CGG CAA AGG AAA ATA AAC ACA GAA TAT AAT					

1467	1476	1485	1494	1503	1512
AAA ATG AGA TAA TCT AGC TTA AAA CTA TAA CTT CCT CTT CAG AAC TCC CAA CCA					

1521	1530	1539	1548	1557	1566
CAT TGG ATC TCA GAA AAA TGC TGT CTT CAA AAT GAC TTC TAC AGA GAA GAA ATA					

1575	1584	1593	1602	1611	1620
ATT TTT CCT CTG GAC ACT AGC ACT TAA GGG GAA GAT TGG AAG TAA AGC CTT GAA					

1629	1638	1647	1656	1665	1674
AAG AGT ACA TTT ACC TAC GTT AAT GAA AGT TGA CAC ACT GTT CTG AGA GTT TTC					

1683	1692	1701	1710	1719	1728
ACA GCA TAT GGA CCC TGT TTT TCC TAT TTA ATT TTC TTA TCA ACC CTT TAA TTA					

1737	1746	1755	1764	1773	1782
GGC AAA GAT ATT ATT AGT ACC CTC ATT GTA GCC ATG GGA AAA TTG ATG TTC AGT					

1791	1800	1809	1818	1827	1836
GGG GAT CAG TGA ATT AAA TGG GGT CAT ACA AGT ATA AAA ATT AAA AAA AAA					

1845	1854	1863	1872	1881	1890
GAC TTC ATG CCC AAT CTC ATA TGA TGT GGA AGA ACT GTT AGA GAG ACC AAC AGG					

1899	1908	1917	1926	1935	1944
GTA GTG GGT TAG AGA TTT CCA GAG TCT TAC ATT TTC TAG AGG AGG TAT TTA ATT					

1953	1962	1971	1980	1989	1998
TCT TCT CAC TCA TCC AGT GTT GTA TTT AGG AAT TTC CTG GCA ACA GAA CTC ATG					

2007	2016	2025	2034	2043	2052
GCT TTA ATC CCA CTA GCT ATT GCT TAT TGT CCT GGT CCA ATT GCC AAT TAC CTG					

2061	2070	2079	2088	2097	2106
TGT CTT GGA AGA AGT GAT TTC TAG GTT CAC CAT TAT GGA AGA TTC TTA TTC AGA					

2115	2124	2133	2142	2151	2160
AAG TCT GCA TAG GGC TTA TAG CAA GTT ATT TAT TTT TAA AAG TTC CAT AGG TGA					

FIG. 1D

2169	2178	2187	2196	2205	2214
TTC TGA TAG GCA GTG AGG	TTA GGG AGC	CAC CAG TTA TGA TGG GAA GTA TGG AAT			
2223	2232	2241	2250	2259	2268
GGC AGG TCT TGA AGA TAA	CAT TGG CCT	TTT GAG TGT GAC TCG TAG CTG GAA AGT			
2277	2286	2295	2304	2313	2322
GAG GGA ATC TTC AGG ACC	ATG CTT TAT TTG GGG CTT	TGT GCA GTA TGG AAC AGG			
2331	2340	2349	2358	2367	2376
GAC TTT GAG ACC AGG AAA	GCA ATC TGA CTT AGG CAT	GGG AAT CAG GCA TTT TTG			
2385	2394	2403	2412	2421	2430
CTT CTG AGG GGC TAT TAC	CAA GGG TTA ATA GGT TTC	ATC TTC AAC AGG ATA TGA			
2439	2448	2457	2466	2475	2484
CAA CAG TGT TAA CCA AGA	AAC TCA AAT TAC AAA TAC	TAA AAC ATG TGA TCA TAT			
2493	2502	2511	2520	2529	2538
ATG TGG TAA GTT TCA TTT	TCT TTT TCA ATC CTC AGG	TTC CCT GAT ATG GAT TCC			
2547	2556	2565	2574	2583	2592
TAT AAC ATG CTT TCA TCC	CCT TTT GTA ATG GAT ATC	ATA TTT GGA AAT GCC TAT			
2601	2610	2619	2628	2637	2646
TTA ATA CTT GTA TTT GCT	GCT GGA CTG TAA GCC CAT	GAG GGC ACT GTT TAT TAT			
2655	2664	2673	2682	2691	2700
TGA ATG TCA TCT CTG TTC	ATC ATT GAC TGC TCT TTG	CTC ATC ATT GAA TCC CCC			
2709	2718	2727	2736	2745	2754
AGC AAA GTG CCT AGA ACA	TAA TAG TGC TTA TGC TTG	ACA CCG GTT ATT TTT CAT			
2763	2772	2781	2790	2799	2808
CAA ACC TGA TTC CTT CTG	TCC TGA ACA CAT AGC CAG	GCA ATT TTC CAG CCT TCT			
2817	2826	2835	2844	2853	2862
TTG AGT TGG GTA TTA TTA	AAT TCT GGC CAT TAC TTC	CAA TGT GAG TGG AAG TGA			
2871	2880	2889	2898	2907	2916
CAT GTG CAA TTT CTA TAC	CTG GCT CAT AAA ACC CTC	CCA TGT GCA GCC TTT CAT			
2925	2934	2943	2952	2961	2970
GTT GAC ATT AAA TGT GAC	TTG GGA AGC TAT GTG TTA	CAC AGA GTA AAT CAC CAG			
2979	2988	2997	3006	3015	3024
AAG CCT GGA TTT CTG AAA	AAA CTG TGC AGA GCC AAA	CCT CTG TCA TTT GCA ACT			
3033	3042	3051	3060	3069	3078
CCC ACT TGT ATT TGT ACG	AGG CAG TTG GAT AAG TGA	AAA ATA AAG TAC TAT TGT			
3087	3096	3105	3114	3123	3132
GTC AAG AAA AAA AAA AAA	AAA AAA AAA AAA AAA AAA	AAA AAA AAA AAA AAA AAA			

AAA A 3'

FIG. 2

1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90	
1	101P3A11	MMVDPNNGNESSATYF	ILIGLPGLEEAQFWL	APPLCSLYLIAVLGN	LTIYIVRTEHSLHE	PHYIFLCNLSGIDIL	ISTSSMPKMLAIFWF					90
2	RALC	-MSSCN---FTHATF	MLIGIPGLEEAHFWP	GFPLLSMYAVALPGN	CIWVPVIVRTERSLHA	PHYIFLCNLSGIDIL	LSTSTMPKILALFWF					86
3	HPRAJ70	-MSSCN---PTHATC	VLIIGIPGLEEAHFWP	GFPLLSMYVAVANCGN	CIWVPVIVRTERSLHA	PHYIFLCNLSGIDIL	LSTSTMPKILALFWP					86
	91	105	106	120	121	135	136	150	151	165	166	180
1	101P3A11	NSTTIQFDACCLQIF	AIHSLSGNESTVLLA	MAPDRYVAICHPLRH	AVTLTLPRVTKIGVA	AVVRGSLPFFPLPL	IKRLAPFCHSNVLSHS					180
2	RALC	DSREITFDACLAQMF	FIHALSAIESTILLA	MAPDRYVAICHPLRH	AAVLNNTVTVOIGMV	AVVRGSLPFFPLPL	IKRLAPFCHSNVLSHS					176
3	HPRAJ70	DSREISIEACLTQMF	FIHALSAIESTILLA	MAPDRYVAICHPLRH	AAVLNNTVTVOIGMV	AVVRGSLPFFPLPL	IKRLAPFCHSNVLSHS					176
	181	195	196	210	211	225	226	240	241	255	256	270
1	101P3A11	YCLHQDVMLACDDI	RNVVYGLVIVISAI	GLOSLIISPSYLLIL	RTVLGLT-REAQAKA	FOTCVSHVCAVPIFY	VPPIGLSMVHREFSKR					269
2	RALC	YCVHQDVMLAYTDT	LENVYGLTALLVM	GVDVNFISLSYFLII	RAVLQLPSKSERAKA	FOTCVSHVCAVPIFY	VPPIGLSMVHREFSKR					266
3	HPRAJ70	YCVHQDVMLAYADT	LENVYGLTALLVM	GVDVNFISLSYFLII	RAVLQLPSKSERAKA	FOTCVSHVCAVPIFY	VPPIGLSMVHREFSKR					266
	271	285	286	300	301	315	316	330	331	345	346	360
1	101P3A11	RDSPLPVLANIVLL	VPPVLMPIVYGVKTK	EIRQRILRLPHVATH	ASEP-----							
2	RALC	LOPIVHVLMQDVYLL	LPPVINPIIYGAKTK	QIRTRVLAMFKISCD	KDIEAGNT							
3	HPRAJ70	LHPIVRVVNGDIYLL	LPPVINPIIYGAKTK	QIRTRVLAMFKISCD	KDIEAGNT							

FIG. 3

GATCAAACCTCTTTCCATTTCAGAGTCCTCTGATTTCAGATTTTAATGTAAACATTTTGGGAAGACAGTATTCAGAAAAA
AATTCCTTAATAAAAAATACAACTCAGATCCTTCAAATATGAACTGGTTGGGGAATCTCCATTTTTTCAATATTATTT
TCCTCTTTGTTTTCTTGCTACGTATAATTATTAAATATCCTGACTAGGTTGTGGTTGGAGGGTTATTACTTTTCATTTTA
CCATGCAGTCCAAATCTAACTGCTTCTACTGATGGTTTACAGCATTCTGAGATAAGAATGGTACATCTAGAGAACATT
TGCCAAAGGCCTAAGCACAGCAAAGGAAAATAAACACAGAATATAATAAAATGAGATAATCTAGCTTAAACTATAACT
TCCTCTTTAGAACTCCAACCACATTTGGATC

FIG. 4

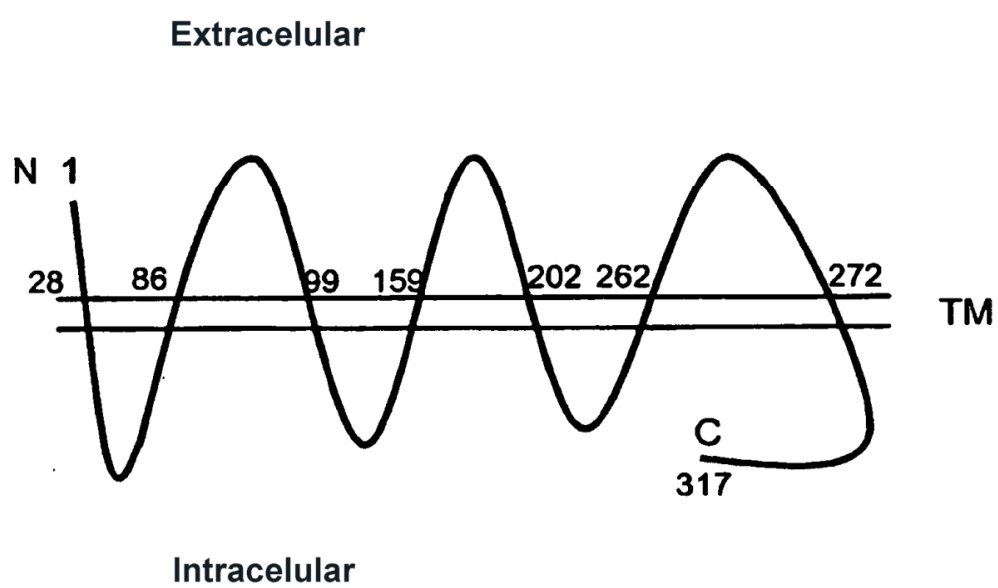


FIG. 5A

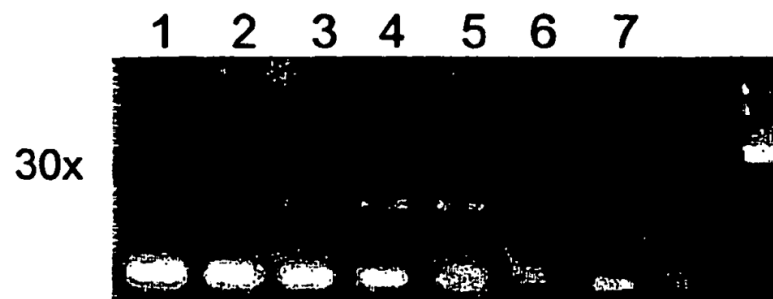


FIG. 5B

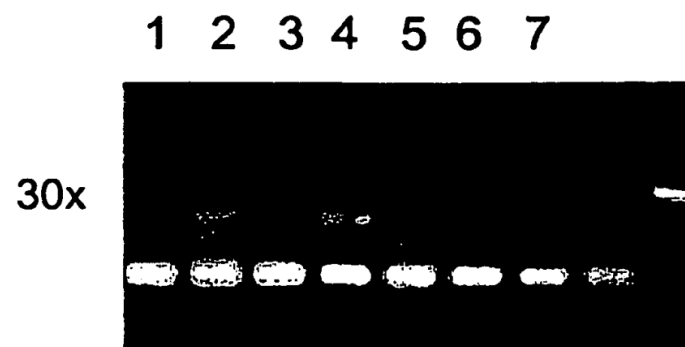


FIG. 6A

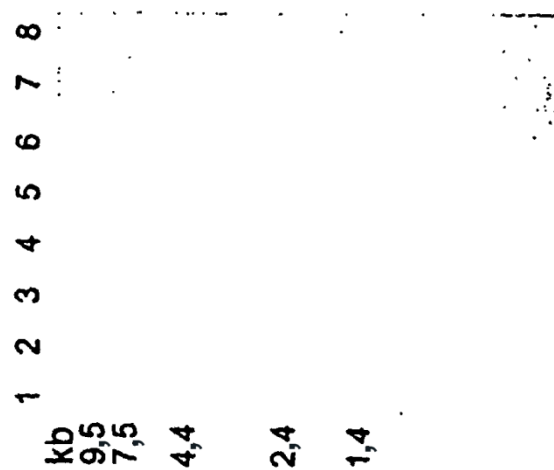


FIG. 6B

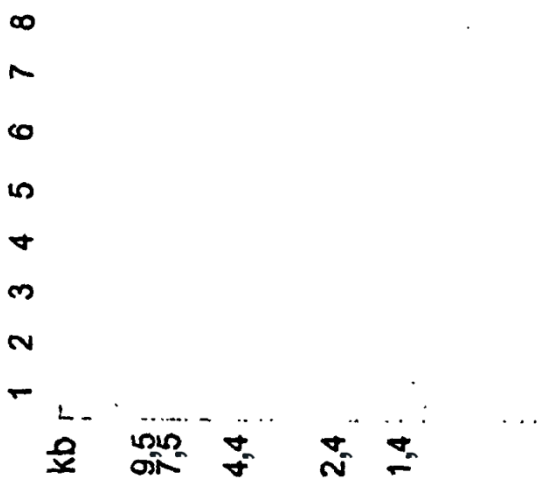


FIG. 6C

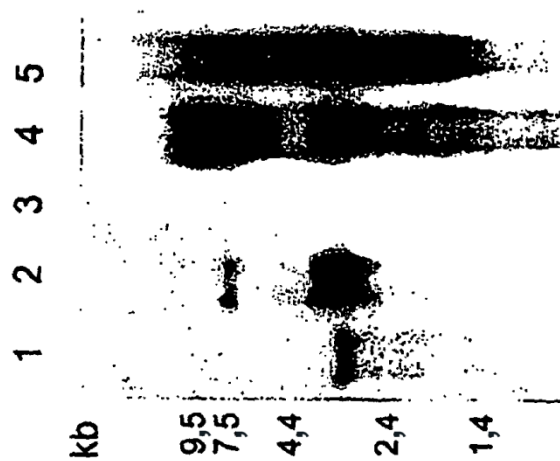


FIG. 7

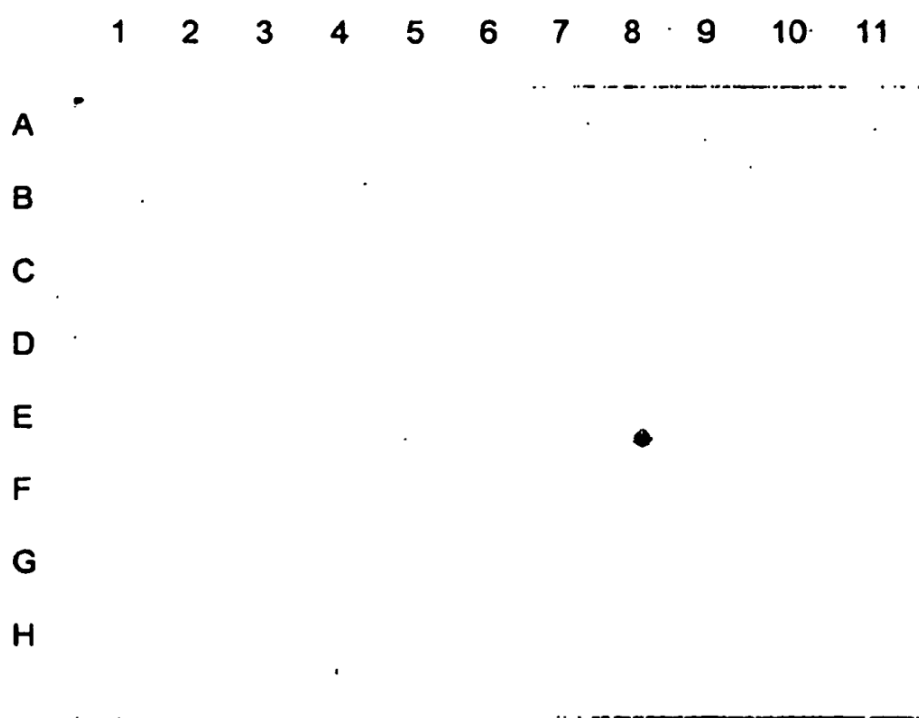


FIG. 8A

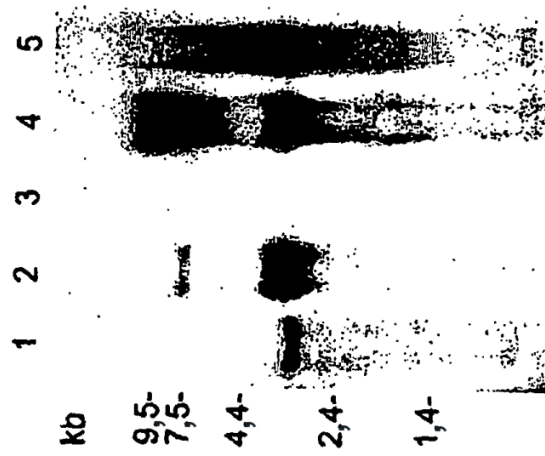


FIG. 8B

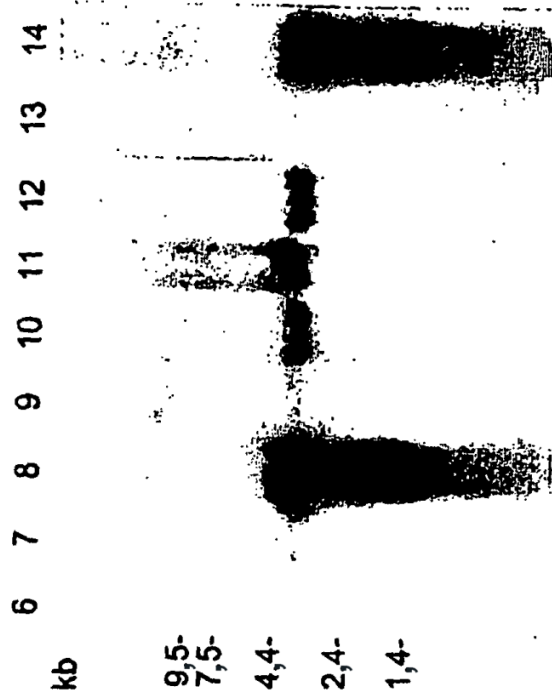


Figura 9A

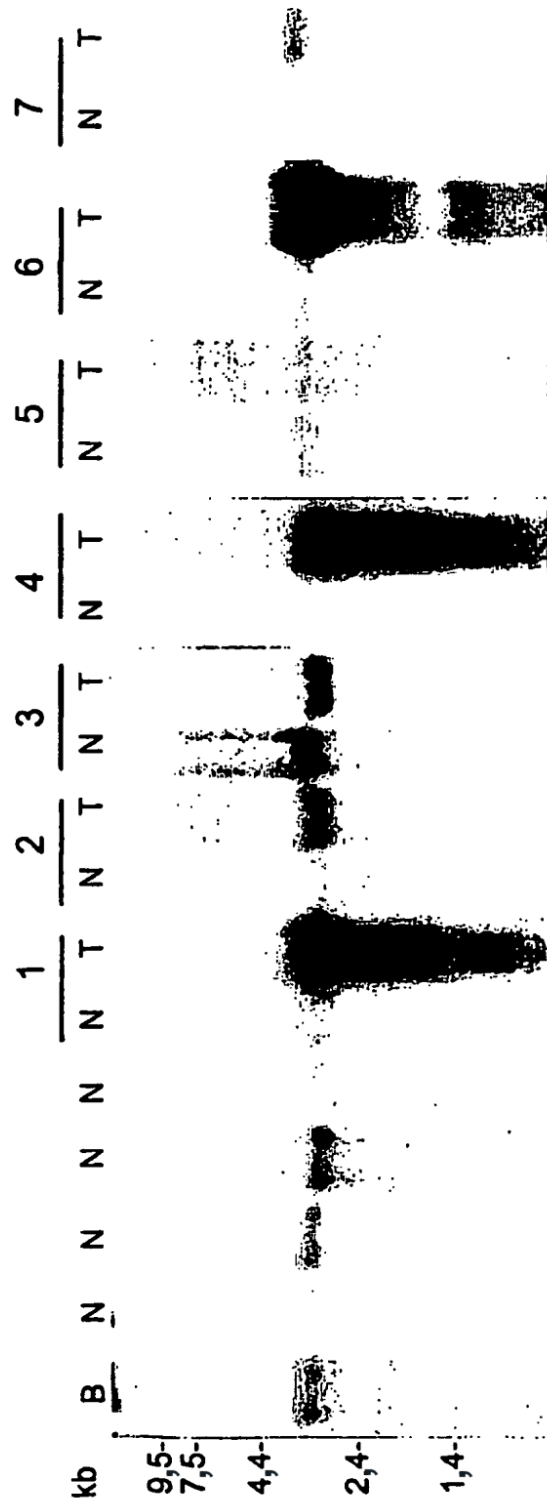


Figura 9B

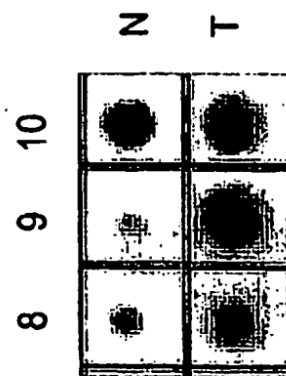


Figura 10

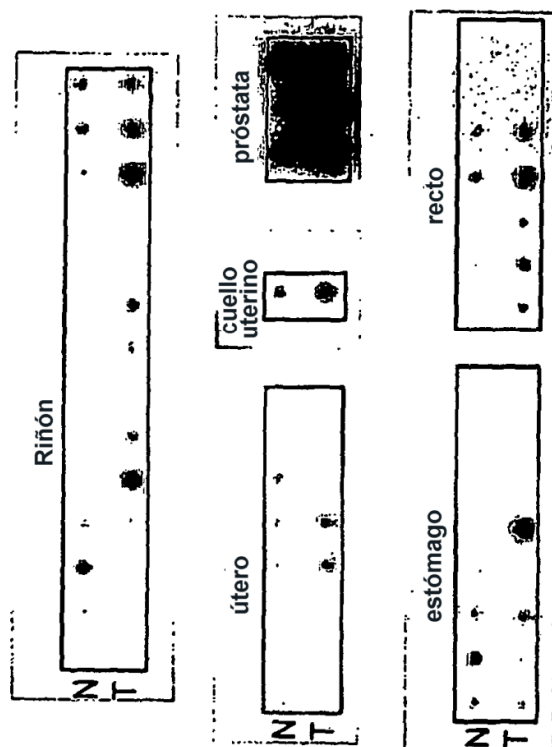


Figura 11A

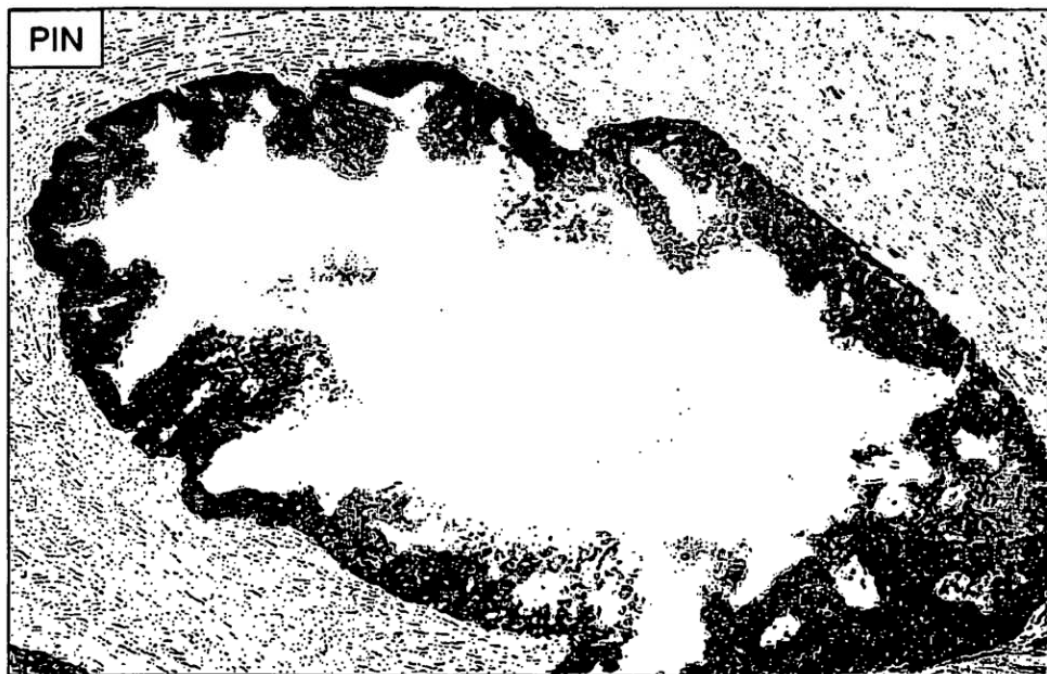


Figura 11B

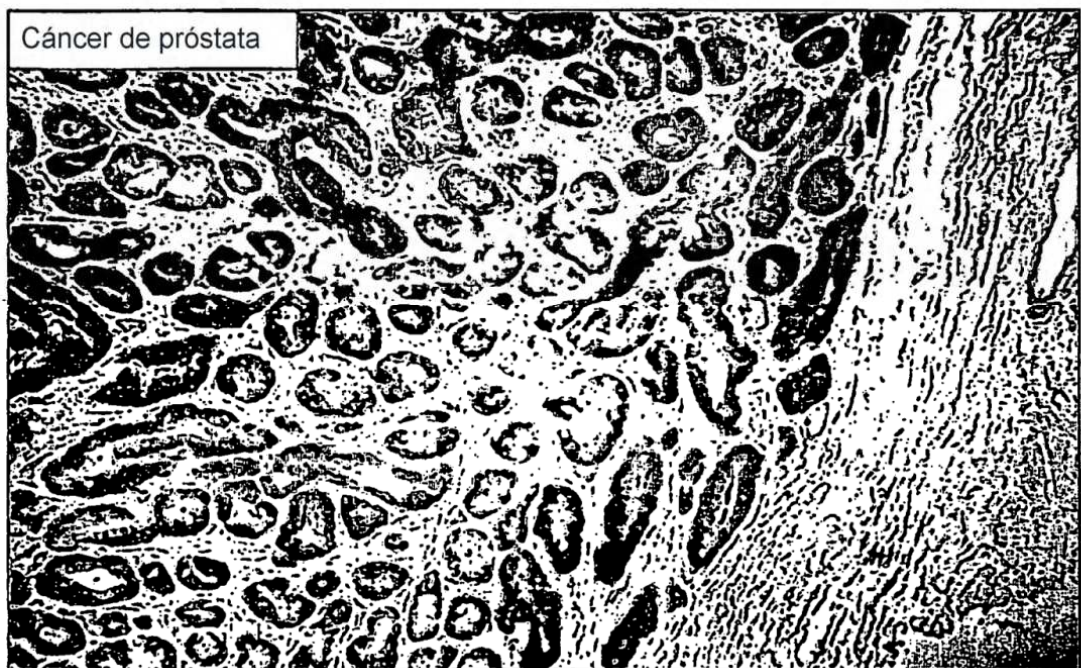


Figura 12A

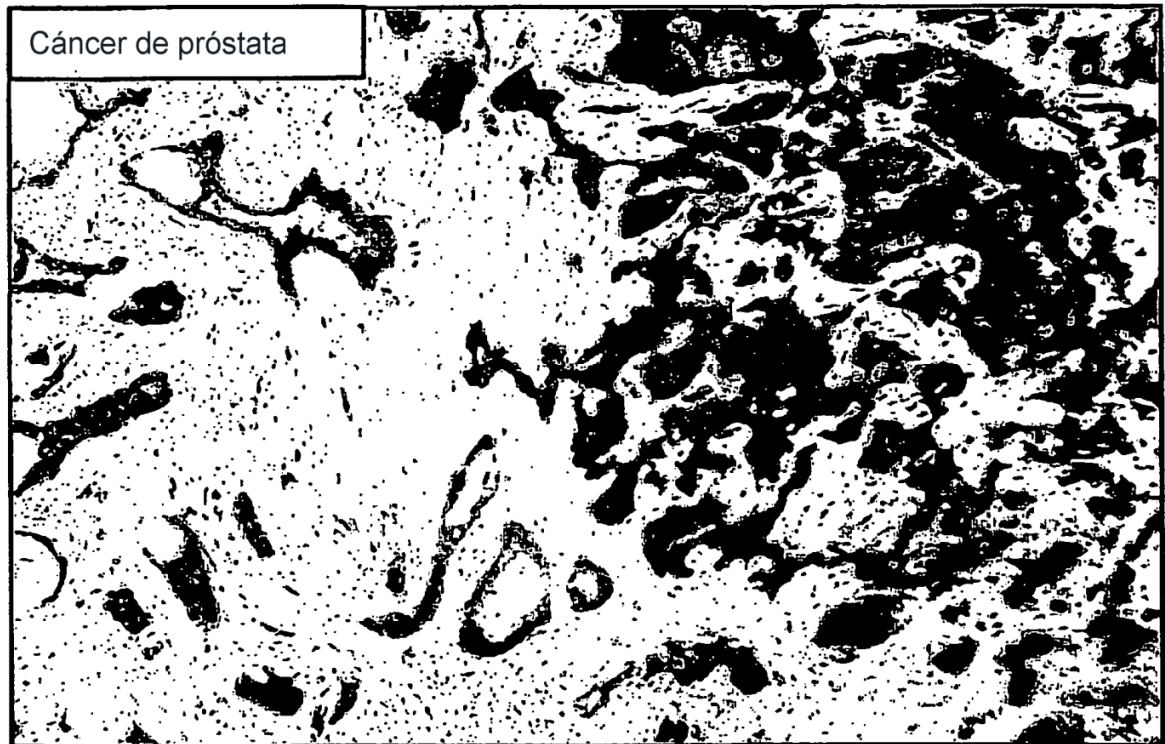


Figura 12B

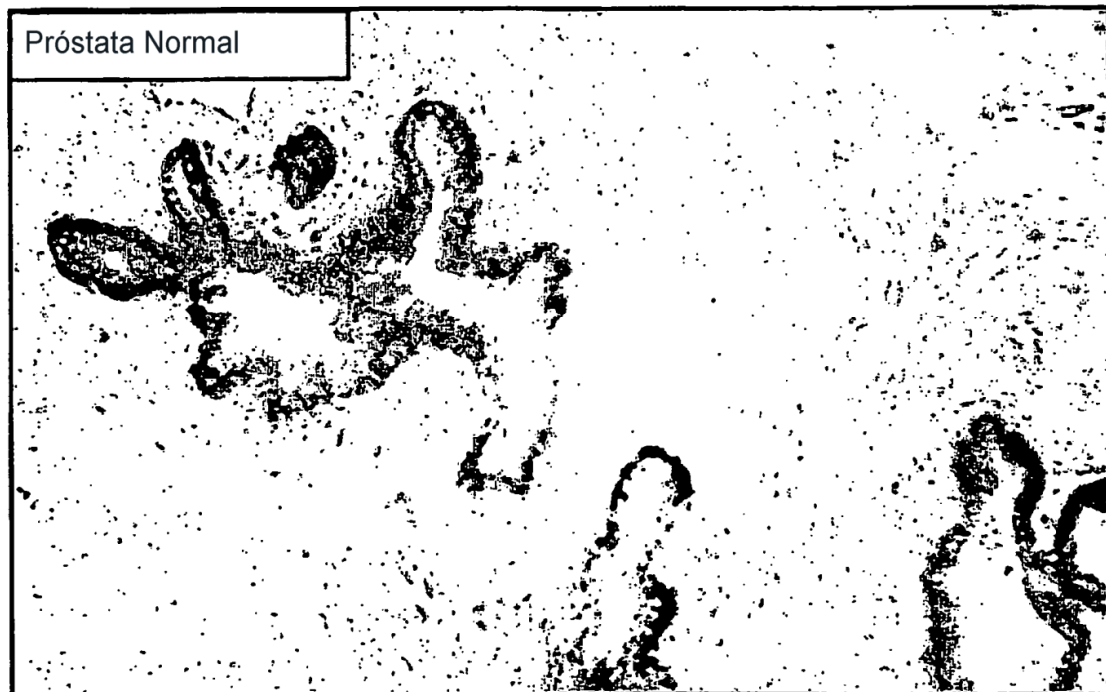


FIG. 13A

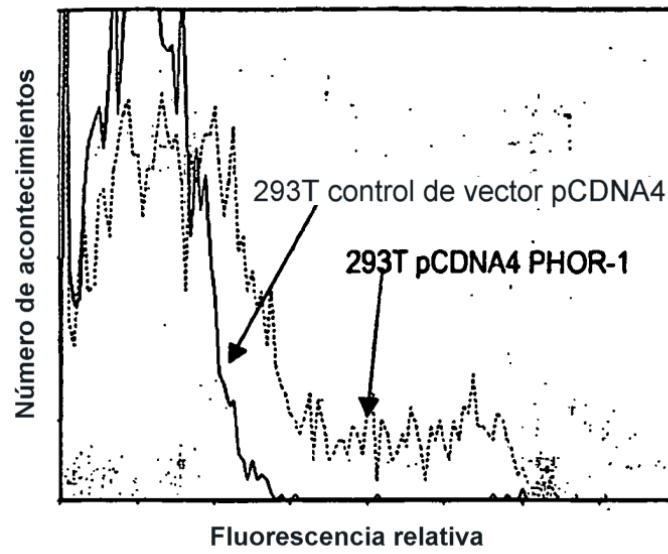


FIG. 13B

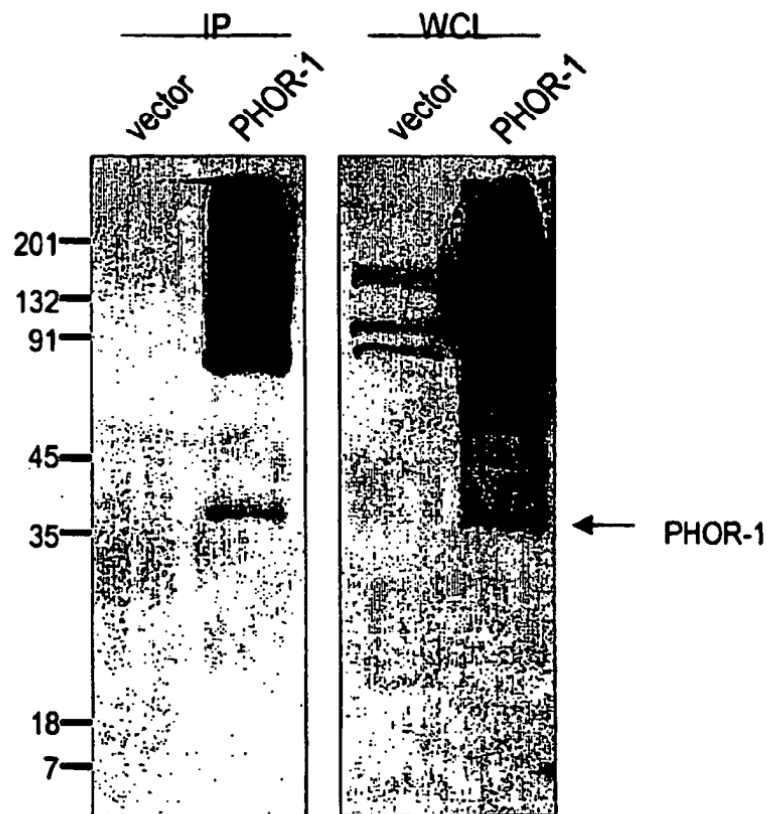


Fig. 14B

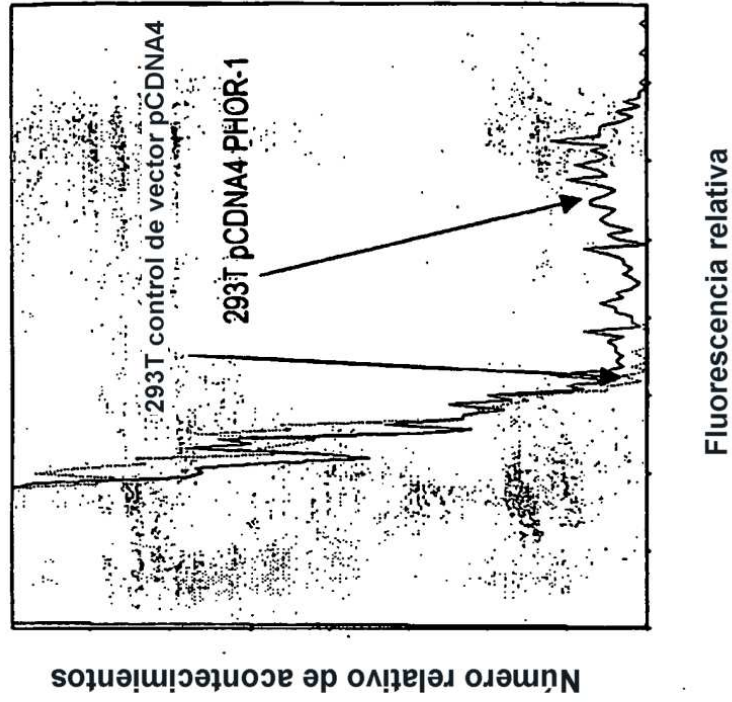


Fig. 14A

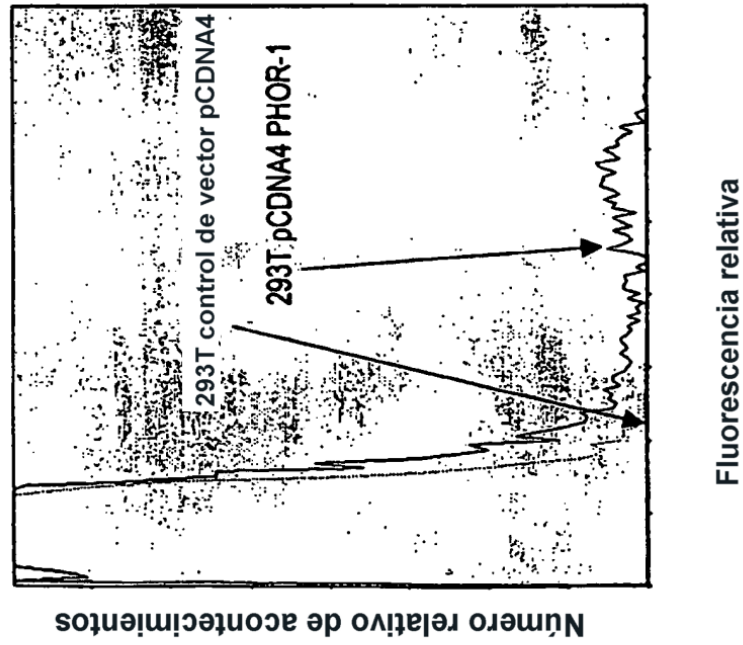


Fig. 15

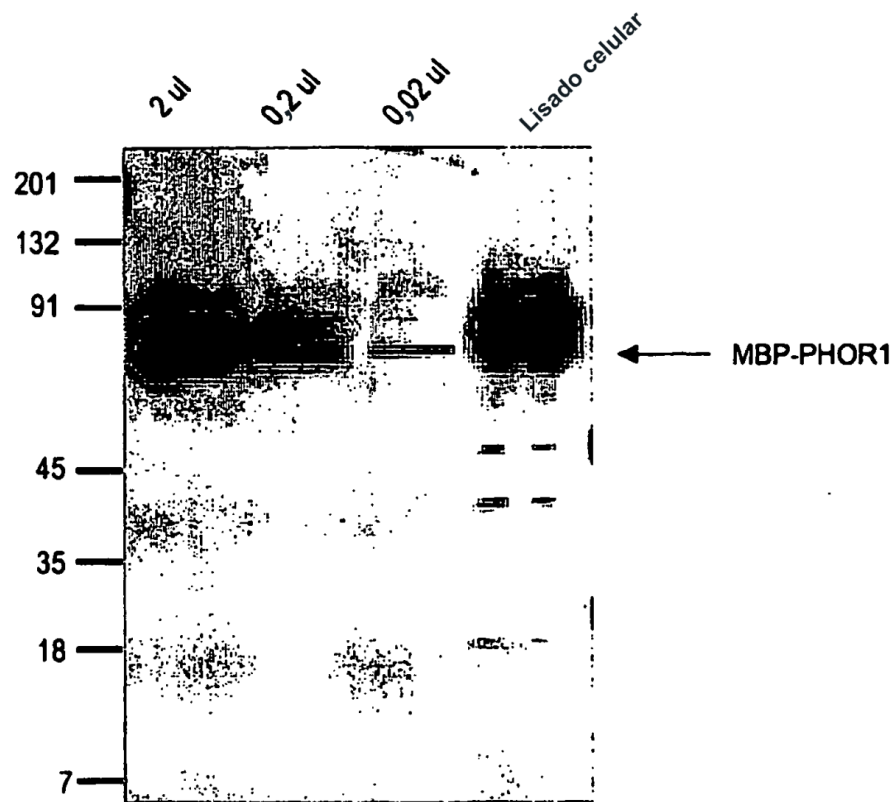


Fig. 16B

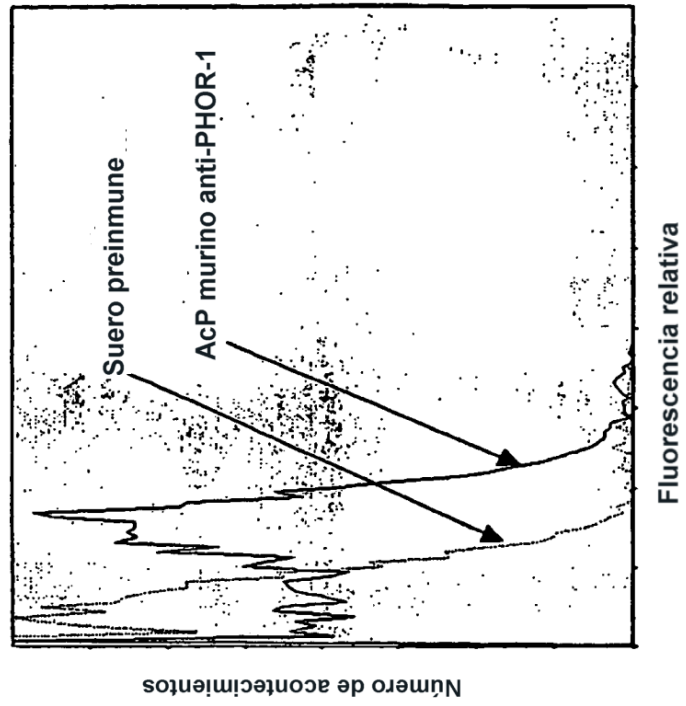


Fig. 16A

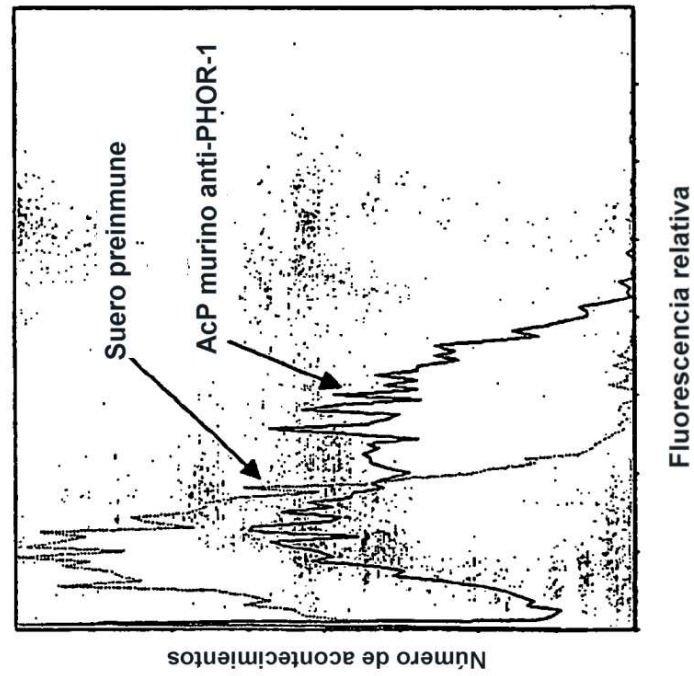




FIG. 17

FIG. 18A

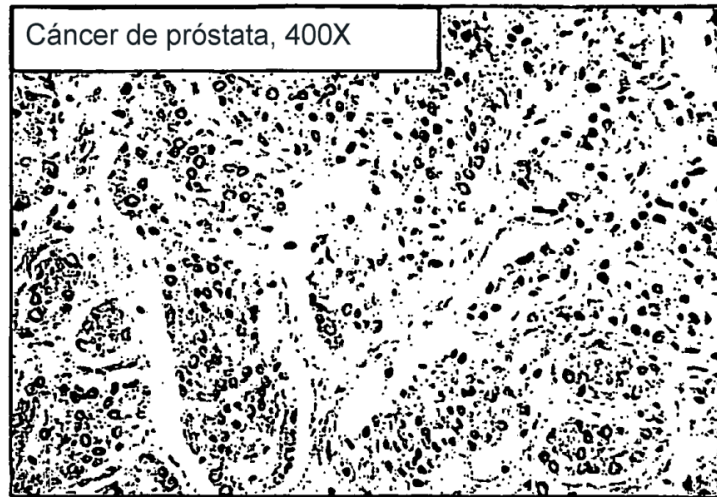


FIG. 18B



FIG. 18C

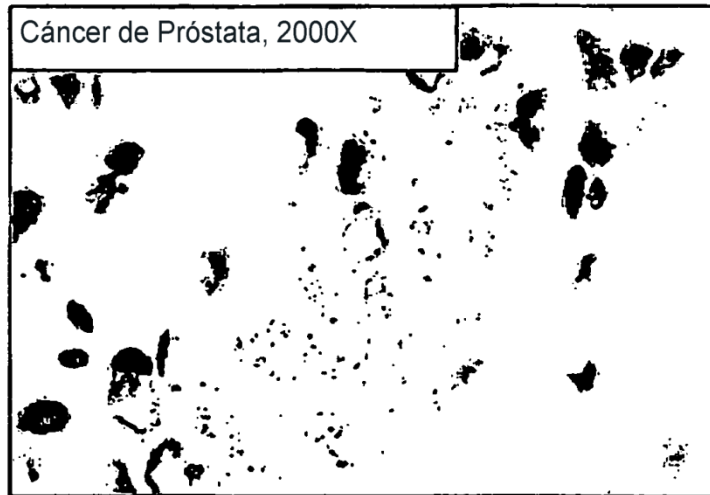


FIG. 18D

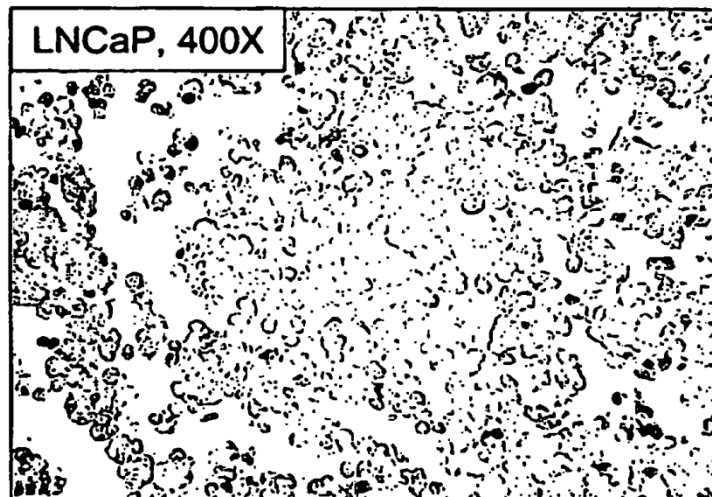


FIG. 18E

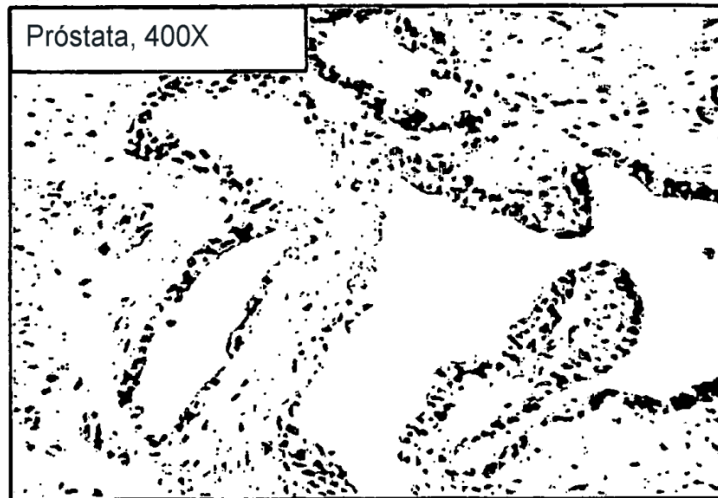


FIG. 18F

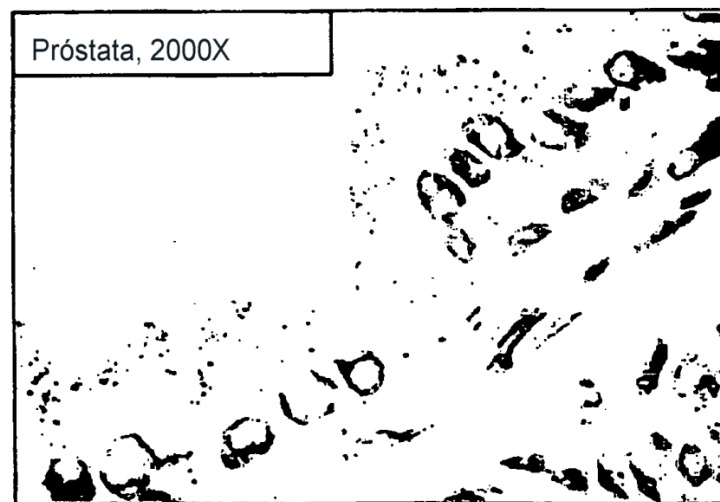


FIG. 19B



FIG. 19A

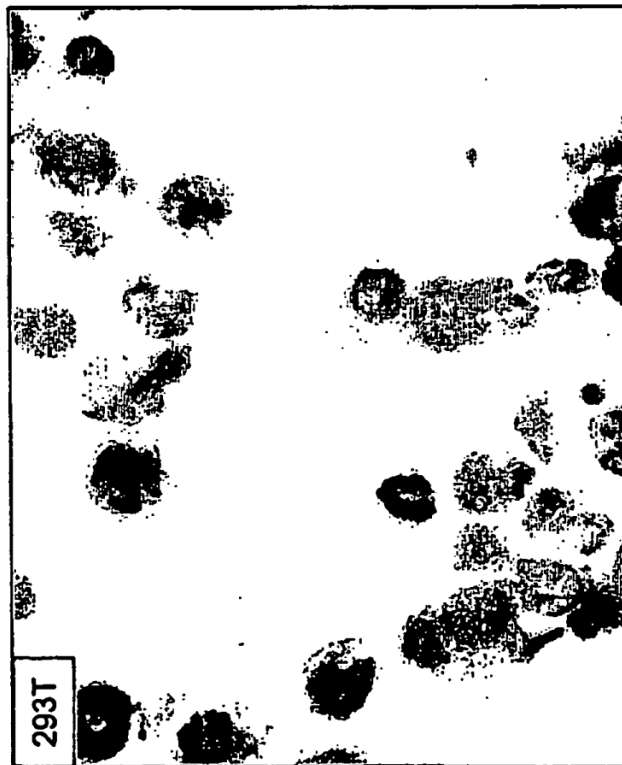


FIG. 19D

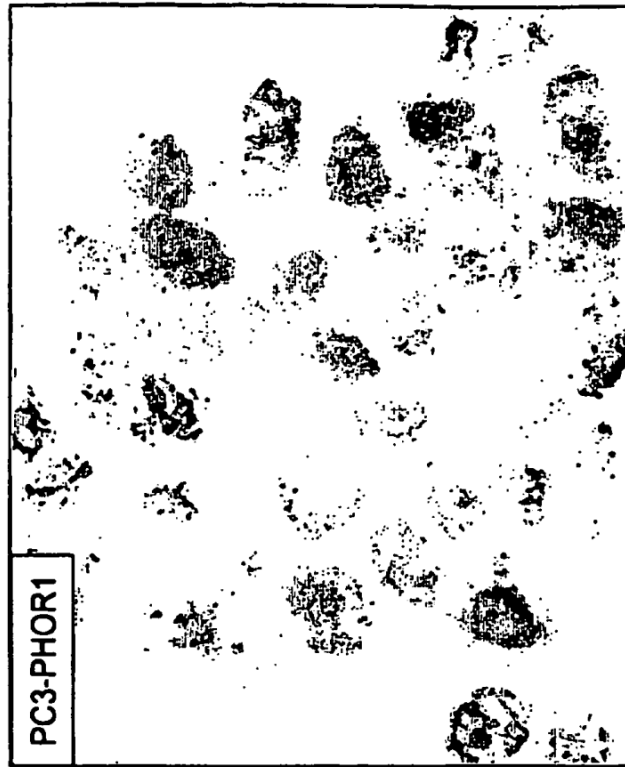


FIG. 19C



FIG. 19E

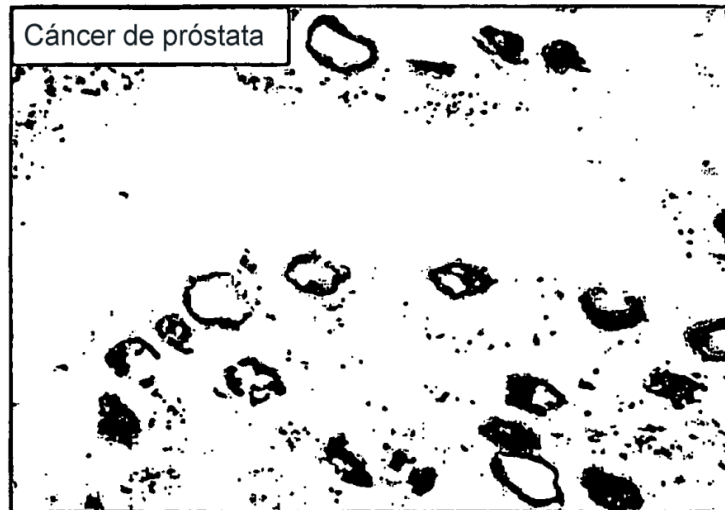


FIG. 19F



FIG. 20A

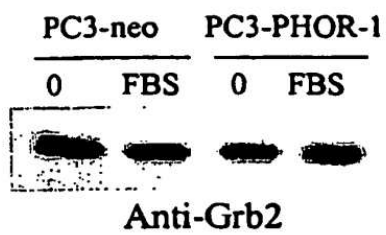
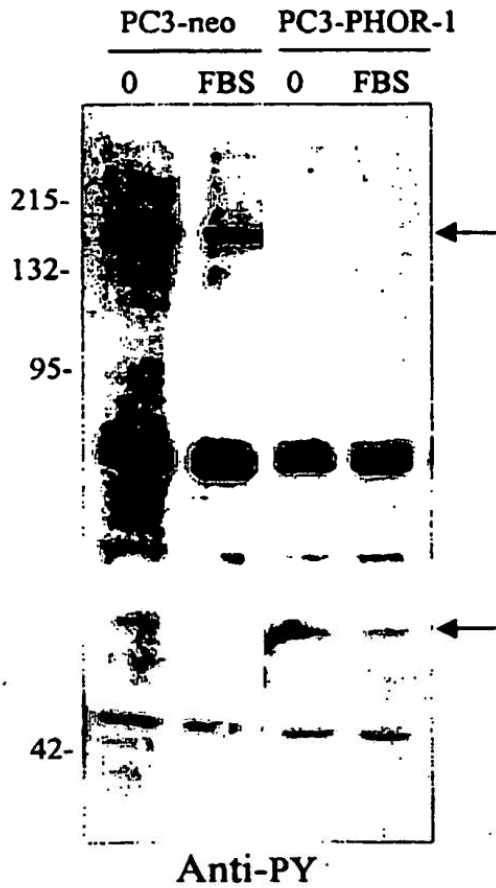


FIG. 20C

FIG. 20B

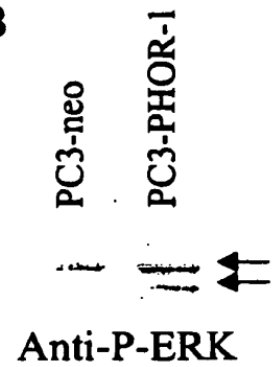


FIG. 20D

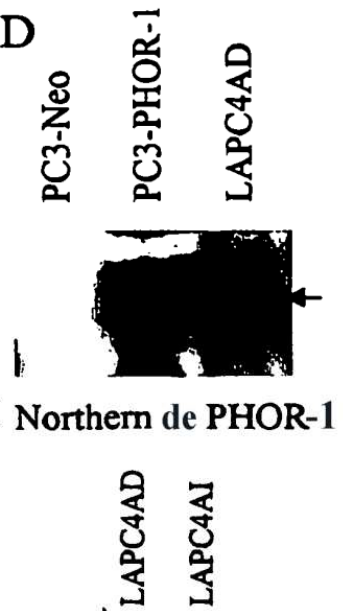


FIG. 20E

Northern de PHOR1

Neo

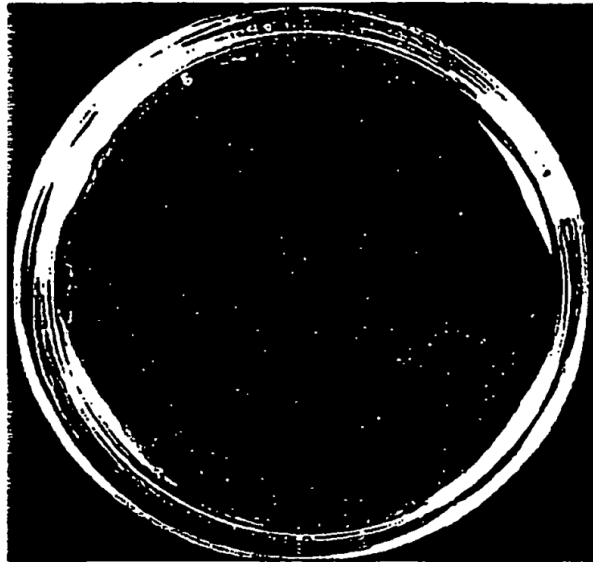


Fig. 21A

PHOR1

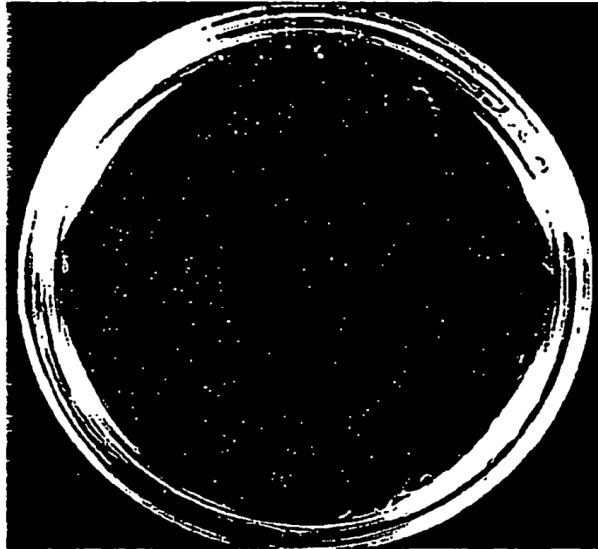


Fig. 21B

Ras

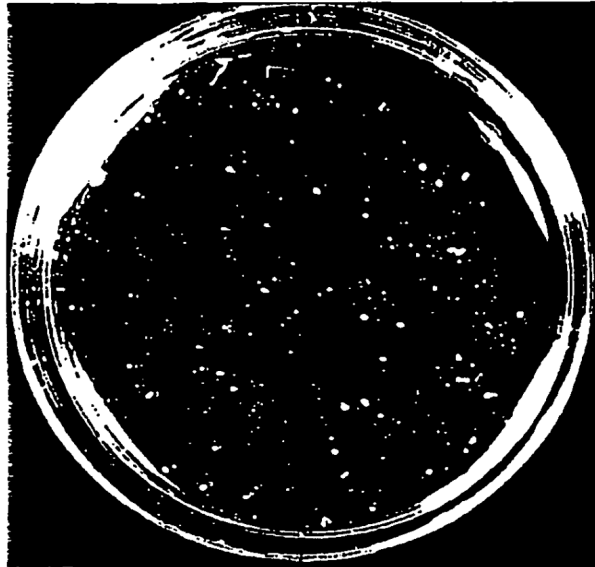


Fig. 21C

FIG. 22

5'			9			18			27			36			45			54
	GCT	GTG	GCC	ATG	TTT	ATT	GGA	GTG	TTG	GAT	CTA	TTC	TTT	ATC	ATC	CTA	TCT	TAT
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	A	V	A	M	F	I	G	V	L	D	L	F	F	I	I	L	S	Y
			63			72			81			90			99			108
	ATC	TTT	ATC	CTT	CAG	GCA	GTT	CTA	CAA	CTC	TCC	TCT	CAG	GAG	GCC	CGC	TAC	AAA
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	I	F	I	L	Q	A	V	L	Q	L	S	S	Q	E	A	R	Y	K
			117			126			135			144			153			162
	GCA	TTT	GGG	ACA	TGT	GTC	TCT	CAC	ATA	GGT	GCC	ATC	TTA	GCC	TTC	TAC	ACA	CCT
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	A	F	G	T	C	V	S	H	I	G	A	I	L	A	F	Y	T	P
			171			180			189			198			207			216
	TCA	GTC	ATC	TCT	TCA	GTC	ATG	CAC	CGT	GTG	GCC	CGC	TGT	GCT	GTG	CCA	CAC	GTC
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	S	V	I	S	S	V	M	H	R	V	A	R	C	A	V	P	H	V
			225			234			243			252			261			270
	CAC	ATT	CTC	CTC	GCC	AAT	TTC	TAT	CTG	CTC	TTC	CCA	CCC	ATG	GTC	AAT	CCC	ATC
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	H	I	L	L	A	N	F	Y	L	L	F	P	P	M	V	N	P	I
			279			288			297			306			315			324
	ATC	TAT	GGC	GTT	AAG	ACC	AAG	CAG	ATC	CGT	GAC	AGT	CTT	GGG	AGT	ATT	CCT	GAG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	I	Y	G	V	K	T	K	Q	I	R	D	S	L	G	S	I	P	E
			333			342			351			360			369			378
	AAA	GGA	TGT	GTG	AAT	AGA	GAG	TGA	GGA	ATA	AGT	GGA	AAA	AGA	GTG	GGG	CCC	AGT
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	K	G	C	V	N	R	E	*										
			387			396			405			414			423			432
	GAA	TGC	TGT	AGT	GGG	CCA	GGG	CTG	TGC	TGA	GAG	TAG	ATG	GGT	CCT	AGA	CTC	CAC
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
			441			450			459			468			477			486
	GTT	TAG	TTC	TTT	TCT	TGT	ATT	ATG	AAA	AGA	ATA	AAT	GAT	GTC	CTG	AAG	CTC	AGA
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
			495															
	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	3'												
	---	---	---	---	---	---												