

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 390 083**

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

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (96) Número de solicitud europea: **08727729 .9**
(96) Fecha de presentación: **16.01.2008**
(97) Número de publicación de la solicitud: **2104744**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **30.09.2009**

(54) Título: **Composiciones y procedimientos para diagnosticar, tratar y prevenir afecciones de próstata**

(30) Prioridad:

16.01.2007 US 885142 P

(73) Titular/es:

**MUSC FOUNDATION FOR RESEARCH
DEVELOPMENT (100.0%)
19 HAGOOD AVENUE, SUITE 909
CHARLESTON, SC 29425, US**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.11.2012

(72) Inventor/es:

DONALD, CARLTON, D.

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.11.2012

(74) Agente/Representante:

ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 390 083 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones y procedimientos para diagnosticar, tratar y prevenir afecciones de próstata.

5 ANTECEDENTES

[0001] Las actuales quimioterapias anticancerosas que están basadas en agentes alquilantes, antimetabolitos y productos naturales son heterogéneas en su mecanismos de acción. Por consiguiente, la mayoría de las mismas también actúan contra células normales, dando como resultado graves efectos secundarios y toxicidad para el 10 paciente.

[0002] La acumulación de mutaciones y la pérdida de las funciones de control celular causan cambios fenotípicos progresivos desde histología normal a pre-cáncer temprano tal como neoplasia intraepitelial (IEN) hasta IEN cada vez más grave hasta cáncer superficial y finalmente hasta enfermedad invasiva. Aunque este proceso puede ser 15 relativamente agresivo en algunos casos, generalmente ocurre de forma relativamente lenta a lo largo de años e incluso décadas. La adicción a oncogenes es la dependencia fisiológica de las células cancerosas de la activación o sobreexpresión continuada de oncogenes individuales para mantener el fenotipo maligno. Esta dependencia ocurre en el entorno de los otros cambios que marcan la progresión neoplásica.

20 **[0003]** La quimioprevención del cáncer se define como la prevención de cáncer o tratamiento en el estado pre-cáncero o incluso antes. El largo periodo de progresión hasta cáncer invasivo es una importante oportunidad científica pero también un obstáculo económico para mostrar el beneficio clínico de fármacos quimiopreventivos candidatos. Por lo tanto, un componente importante de la investigación en el desarrollo de agentes quimiopreventivos en los últimos años ha sido identificar criterios de valoración (pre-cáncer) anteriores o 25 biomarcadores que predigan de forma precisa un beneficio clínico del agente o efecto reductor de la incidencia del cáncer. En muchos cánceres, la IEN es un criterio de valoración temprano tal como en próstata.

BREVE DESCRIPCIÓN RESUMIDA

30 **[0004]** De acuerdo con el fin de esta invención, como se realiza y se describe ampliamente en la presente memoria, esta invención se refiere a composiciones y procedimientos para diagnosticar, prevenir y tratar cáncer de próstata y neoplasia intraepitelial de próstata (PIN).

[0005] Se expondrán ventajas adicionales del procedimiento desvelado y composiciones en parte en la siguiente 35 descripción y en parte se comprenderán a partir de la descripción o se pueden aprender mediante la práctica del procedimiento desvelado y las composiciones. Las ventajas del procedimiento y las composiciones desveladas se realizarán y conseguirán mediante los elementos y combinaciones señalados en particular en las reivindicaciones dependientes. Se ha de entender que tanto la anterior descripción general como la siguiente descripción detallada son solamente ilustrativas y explicativas y no son limitantes de la invención como se reivindica.

40 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0006] Los dibujos adjuntos, que se incorporan en y constituyen una parte de esta memoria, ilustran varias realizaciones de los procedimientos y composiciones desvelados y, junto con la descripción, sirven para explicar los 45 principios de los procedimientos y las composiciones desvelados.

La Figura 1 muestra análisis de RT-PCR cuantitativa (QRT-PCR) de la expresión de beta-defensina-1 (DEFB1). Para verificar la inducción de la expresión de DEFB1 se realizó QRT-PCR. La Figura 1A muestra los niveles de expresión relativos de DEFB1 en comparación en muestras clínicas de 6 pacientes que se sometieron a 50 prostatectomías radicales. La Figura 1B muestra los niveles de expresión relativos de DEFB1 en comparación en muestras clínicas prostáticas benignas y malignas, células de hPrEC y en líneas celulares de cáncer de próstata antes y después de la inducción de DEFB1. La Figura 1C muestra los niveles de expresión relativos de DEFB1 analizados en tejido benigno, tejido maligno y neoplasia intraepitelial de próstata (PIN) en una única 55 afección tisular. La Figura 1D muestra la expresión de DEFB1 en tejido benigno, tejido maligno y PIN en un paciente en comparación con el nivel de expresión de DEFB1 promedio encontrado en tejido benigno.

La Figura 2 muestra el análisis microscópico de cambios inducidos por DEFB1 en la integridad de membrana y morfología celular. La morfología celular de DU145, PC3 y LNCaP se analizó mediante microscopía de contraste de fases después de 48 horas de la inducción de DEFB 1. La ondulación de membrana se indica mediante flechas negras y los cuerpos apoptóticos están indicados con flechas blancas.

60 La Figura 3 muestra el análisis de la Citotoxicidad de DEFB 1 en Células de Cáncer de Próstata. Las líneas celulares de próstata DU145, PC3 y LNCaP se trataron con PonA para inducir la expresión de DEFB1 durante 1-3 días después de lo cual se realizó un ensayo de MTT para determinar la viabilidad celular. Los resultados representan media ± d. t., n=9.

- 5 La Figura 4 muestra la inducción de muerte celular en células DU145 y PC3 mediante DEFB1. La expresión de DEFB1 se indujo en líneas celulares de cáncer de próstata DU145 (A) y PC3 (B) y después se sometió a tinción con anexina V/FITC/yoduro de propidio y análisis de citometría de flujo. Se consideraron apoptóticas las células positivas a yoduro de propidio y anexina V. Los tiempos de inducción se muestran debajo de cada panel. Los números cerca de los recuadros para cada punto de tiempo representan los porcentajes de células yoduro de propidio (PI)⁻ anexina V⁺ (cuadrante derecho inferior) y células PI⁺ anexina V⁺ (cuadrante derecho superior). Los datos son de un único experimento que es representativo de tres experimentos separados.
- 10 10 La Figura 5 muestra el análisis de pan-caspasa después de la inducción de DEFB1. Las células DU145 y PC3 se tiñeron con fluorometil cetona marcada con FAM-VAD-FMK para detectar la actividad de caspasa. Las células eran visibles bajo DIC para cada estado. El análisis microscópico confocal no mostró tinción de caspasa en células DU145 (B) de control, PC3 (F) y LNCaP (J). Las células tratadas con PonA durante 24 horas para inducir DEFB1 mostraron actividad de caspasa en DU145 (D) y PC3 (H). No se detectó actividad de caspasa en LNCaP (L).
- 15 15 La Figura 6 muestra el silenciamiento de la expresión de la proteína del gen homeótico de caja emparejada 2 (PAX2) después del tratamiento de ARNip de PAX2. La Figura 6A muestra el análisis de transferencia de Western de células PC3 y DU145 transfectadas con dúplex de ARNip de PAX2 el día cero (carril 1), día dos (carril 2) y el día cuatro (carril 3). La Figura 6B muestra el análisis de transferencia de Western de células PC3 y DU145 transfectadas con dúplex de ARNip de PAX2 el día cero (carril 1), día dos (carril 2), día cuatro (carril 3) y día 6 (carril 4). La proteína de PAX2 era indetectable tan pronto como después de cuatro días de tratamiento (carril 3) en células DU145 y después de seis días de tratamiento en PC3. Las transferencias se separaron y re-sondaron para β-actina como un control interno.
- 20 20 La Figura 7 muestra el análisis del desarrollo de células de cáncer de próstata después de tratamiento con ARNip de PAX2. El análisis con microscopía de contraste de fases de DU145, PC3 y LNCaP a los 6 días en presencia de medio de cultivo normal. El tratamiento con ARNip de control negativo no tuvo ningún efecto sobre las células. Sin embargo, hubo una reducción significativa en el número de células en las tres líneas después de tratamiento con ARNip de PAX2.
- 25 25 La Figura 8 muestra el análisis de la muerte celular después del silenciamiento de ARNip de PAX2. Las líneas celulares de cáncer de próstata PC3, DU145 y LNCaP se trataron con 0,5 µg de un conjunto de cuatro ARNip de PAX2 o cuatro ARNip de control no específicos durante 2, 4 o 6 días después de lo cual se realizó el ensayo de MTT para determinar la viabilidad celular. Los resultados representan la media ± d.t., n=9.
- 30 30 La Figura 9 muestra el análisis de la actividad de caspasa. Las células DU145, PC3 y LNCaP se tiñeron con fluorometilcetona marcada con carboxifluoresceína para detectar la actividad de caspasa después de tratamiento con ARNip de PAX2. El análisis de microscopía confocal de células no tratadas y tratadas muestra células que eran visibles con DIC. El análisis con fluorescencia no mostró tinción de caspasa en DU145 (B) de control, células PC3 (F) y células LNCaP (J). Sin embargo, la célula tratada con ARNip de PAX2 indujo actividad de caspasa en DU145 (D), PC3 (H) y LNCaP (L).
- 35 35 La Figura 10 muestra el análisis de factores apoptóticos después de tratamiento de ARNip de PAX2. Los cambios en la expresión de los factores pro-apoptóticos se compararon en células de control no tratadas y en células tratadas durante seis días con ARNip de PAX2. La Figura 10A muestra los niveles de expresión de proteína X asociada a Bcl-2 (BAX) aumentados en DU145, PC3 y LNCaP. La Figura 10B muestra la expresión de agonista de muerte de dominio de interacción con BH3 (BID) aumentada en DU145 y LNCaP, pero cambio en PC3. La Figura 10C muestra los niveles de expresión del promotor de muerte asociado a Bcl-2 (BAD) aumentados en las tres líneas celulares.
- 40 40 La Figura 11 muestra el modelo de unión de PAX2 a la secuencia de reconocimiento de ADN. El represor transcripcional de PAX2 se une al sitio de reconocimiento CCTTG (SEC ID N°: 1) inmediatamente adyacente a la caja TATA de DEFB1 evitando la transcripción y la expresión de la proteína DEFB1. La inhibición de la expresión de la proteína PAX2 permite la expresión de DEFB normal.
- 45 45 La Figura 12 ilustra la construcción indicadora de DEFB1. El promotor de DEFB1 que consiste en las primeras 160 bases cadena arriba del sitio de inicio de ARNm se amplificó mediante PCR de la célula DU145 y se ligó en el plásmido indicador de luciferasa pGL3.
- 50 50 La Figura 13 muestra la inhibición de los resultados de PAX2 en la expresión de DEFB 1. Se trataron DU145, PC3, LNCaP y HPrEC durante 48 horas con ARNip de PAX2. El análisis mediante QRT-PCR antes del tratamiento no mostró expresión de DEFB1 en DU145, PC3 y LNCaP. Sin embargo se restauró la expresión de DEFB 1 después del tratamiento en todas las líneas. No hubo ningún cambio en la expresión de DEFB 1 después del tratamiento de ARNip de HPrEC con PAX2 anulado.

- 5 La Figura 14 muestra la inhibición de los resultados de PAX2 en actividad de promotor de DEFB 1 aumentada. Se generaron las construcciones de promotor de PC3/pGL3 y promotor de DU145/pGL3 y se introdujeron mediante transfección respectivamente en células PC3 y DU145. La actividad de promotor se comparó antes y después de la inhibición de PAX2 mediante tratamiento de ARNip. La actividad del promotor de DEFB1 aumentó 2,65 veces en DU145 y 3,78 veces en PC3 después del tratamiento.
- 10 La Figura 15 muestra el análisis de ChIP de la unión de PAX2 al promotor de DEFB 1. El análisis de ChIP se realizó en células DU145 y PC3. Después de la inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-PAX2 se realizó la PCR para detectar la región promotora de DEFB1 que contenía el sitio de reconocimiento de PAX2 GTTCC. Esto demuestra que el represor transcripcional de PAX2 está unido al promotor de DEFB 1 en líneas celulares de cáncer de próstata.
- 15 La Figura 16 muestra la estructura predicha de PrdPD y PrdHD con ADN. Las coordenadas de las estructuras del PrdPD unido a ADN (Xu *et al.*, 1995) y el PrdHD unido a ADN (Wilson *et al.*, 1995) se usaron para construir un modelo de los dos dominios cuando se unieron a un sitio PH0. Los sitios de unión individuales se ponen en contacto próximos entre sí con una orientación específica como se indica. El dominio RED se orienta basándose en la estructura cristalina de PrdPD.
- 20 La Figura 17 muestra la comparación de las secuencias de consenso de diferentes dominios emparejados. En la parte superior de la Figura está dibujada una representación esquemática de los contactos de proteína+ADN descritos en el análisis cristalográfico del complejo de dominio emparejado con Prd±ADN. Los recuadros vacíos indican hélices a, los recuadros sombreados indican láminas b y una línea gruesa indica un giro b. La puesta en contacto con aminoácidos se muestra por un código de una sola letra. Solamente se muestran los contactos directos de aminoácido±base. Los círculos vacíos indican contactos de surco importantes mientras que las flechas rojas indican contactos de surco menores. Este esquema está alineado con todas las secuencias de consenso conocidas para proteínas de dominio emparejado (solamente se muestran las cadenas superiores). Las líneas verticales entre las secuencias consenso indican pares de bases conservados. La numeración de las posiciones se muestra en la parte inferior de la Figura.
- 25 La Figura 18 muestra el marcaje de PAX2 como una estrategia quimiopreventiva. La expresión de PAX2 aberrante es un acontecimiento temprano en el inicio y la progresión de cáncer. La inhibición de PAX2 durante displasia u otro estadio precanceroso se puede usar para la prevención del cáncer.
- 30 La Figura 19 muestra el efecto de angiotensina II (Ang II) en la expresión de PAX2 en células DU145. Para determinar el efecto de Ang II sobre la expresión de PAX2 se controlaron los niveles de proteína de DEFB1 después de tratamiento. En este caso, los niveles de la expresión de PAX2 aumentaron tan pronto como 4 horas y persistieron hasta 48 horas.
- 35 La Figura 20A muestra el efecto de Losartan (Los) sobre la expresión de PAX2 en DU145. Las células DU145 se trataron con el bloqueante del receptor de angiotensina II de tipo 1 (ART1) Losartan. La QRT-PCR mostró que los niveles de mensaje de PAX2 estaban disminuidos al menos la mitad después del tratamiento. La Figura 20B muestra el efecto de un bloqueante del receptor de angiotensina II de tipo 2 (ATR2) sobre la expresión de PAX2 en DU145. Para determinar el efecto del receptor de ATR2 sobre la expresión de PAX2 se trataron células DU145 con el bloqueante del receptor de ATR2 PD123319. En este caso, la expresión de PAX2 estaba aumentada de 7 a 8 veces.
- 40 La Figura 21 muestra el efecto de Los que bloquea AngII sobre la expresión de PAX2 en DU145. El tratamiento de células DU145 con 5 μ M de AngII durante 72 horas dio como resultado un aumento de 2 veces en la expresión de PAX2. Además, el tratamiento con 10 μ M durante 72 horas dio como resultado más de un aumento de 3 veces en la expresión. El tratamiento de células con 5 μ M de Losartan suprimió la proliferación en 50%. Además, el tratamiento con Losartan durante 30 min antes del tratamiento con AngII bloqueó el efecto de AngII sobre la proliferación.
- 45 La Figura 22 muestra que AngII aumenta la proliferación de células DU145. El tratamiento de células DU145 con 5 μ M de AngII durante 72 horas dio como resultado un aumento de 2 veces en la proliferación. Además, el tratamiento con 10 μ M durante 72 horas dio como resultado más de un aumento de 3 veces en la proliferación.
- 50 La Figura 23 muestra el efecto de los inhibidores de Los y MAP Quinasa sobre la expresión de PAX2 en células DU145. La Figura 23A muestra que el tratamiento de células DU145 con Losartan suprime la expresión de fósforo-ERK 1/2 y PAX2; La Figura 23B muestra los inhibidores de MEK quinasa y AICAR suprime la expresión de la proteína PAX2; La Figura 23C muestra los inhibidores de MEK quinasa y Losartan suprime la expresión de la proteína fosfo-STAT3.

- 5 La Figura 24 muestra el efecto de los inhibidores de Los y MEK quinasa sobre la activación de PAX2 en células DU145. La Figura 24A muestra el tratamiento de células DU145 con inhibidores de la señalización de AT1R que da como resultado una disminución en los niveles de proteína fosfo-PAX2, que es la forma activa de PAX2. Además, el tratamiento con el inductor de AMP quinasa AICAR dio como resultado expresión de PAX2 suprimida. La Figura 24B muestra la inhibición de la señalización de AT1R con niveles de fosfo-JNK disminuidos por Los. Sin embargo, AngII aumentó los niveles de proteína fosfo-JNK.
- 10 La Figura 25 muestra que AngII aumenta la expresión de PAX2 y disminuye la de DEFB1 en células hPrEC. Para determinar el efecto de AngII sobre los niveles de PAX2 en hPrEC, las células se trataron durante 72 y 96 horas y se examinó la expresión de PAX2 y DEFB1 mediante QRT-PCR. En este caso, el tratamiento con AngII dio como resultado aumentos espectaculares en PAX2 hasta niveles similares a las células de cáncer de próstata PC3. Por el contrario, la expresión de DEFB1 estaba significativamente reducida después del tratamiento con AngII.
- 15 La Figura 26 muestra el esquema de la señalización de AngII y cáncer de próstata de PAX2. La expresión de PAX2 en células de cáncer de próstata está regulada mediante la ruta de señalización de AT1R. Específicamente, la cascada de señalización de MEK quinasa conduce a expresión aumentada de PAX2. Además, el AT1R y AngII regula positivamente la activación de PAX2 mediante JNK.
- 20 La Figura 27 muestra el esquema del bloqueo de la expresión de PAX2 como una terapia para cáncer de próstata. La Figura 27A muestra que la expresión de PAX2 está regulada por la ruta de señalización de AT1R. La inhibición de la expresión de PAX2 da como resultado la re-expresión de DEFB 1 y muerte de célula cancerosa. La Figura 27B muestra compuestos que bloquean el AT1R, quinasas cadena abajo o directamente suprime PAX2 que ofrece una nueva estrategia para tratar cáncer de próstata.
- 25 La Figura 28 muestra la comparación de expresión de DEFB1 y PAX2 con la Puntuación de Gleason. Los niveles de expresión relativa de DEFB 1 se compararon en muestras clínicas benignas de 6 pacientes que se sometieron a prostatectomías radicales. En este caso, la puntuación de Gleason se correlacionó inversamente con los niveles de expresión de DEFB1 en tejido de próstata benigno adyacente. Los pacientes con niveles de expresión de DEFB1 relativos superiores a 0,005 tenían puntuaciones de Gleason de 6. Sin embargo, los que tenían niveles de expresión inferiores a 0,005 tenían puntuaciones de Gleason de 7.
- 30 La Figura 29 muestra la proporción de PAX2-DEFB1 como un factor predictivo para el desarrollo de cáncer de próstata. Se realizó QRT-PCR en secciones tisulares de próstata de microdissección de captura con láser (LCM) para determinar los niveles de expresión relativa de DEFB1 y PAX2. Los niveles de expresión de DEFB1 disminuyeron de normal a PIN hasta cáncer. Sin embargo, la expresión de PAX2 aumentó desde normal a PIN a cáncer. Además, el paciente Nº 1457 con cáncer con puntuación de Gleason 6 tenía más DEFB1 en tejido normal y PIN y en comparación con el paciente Nº 1569 con cáncer con puntuación de Gleason 7. Por el contrario, el paciente Nº 1569 tenía mayores niveles de PAX2 en regiones cancerosas en comparación con el paciente Nº 1457.
- 35 La Figura 30 muestra que el Factor Predictivo de Donald (DPF) está basado en la proporción de expresión relativa de PAX2-DEFB 1. Un aumento en el DPF del tejido de próstata aumenta la probabilidad de desarrollar cáncer de próstata. El tejido con una proporción de PAX2-DEFB1 entre 0 y 39 basada en el DPF era normal (benigno). El tejido con una proporción de PAX2-DEFB 1 entre 49 y 99 representó PIN (pre-cánceroso) basada en la escala de DPF. Finalmente, el tejido con una proporción de PAX2-DEFB1 entre 100 y 500 era maligno (cáncer de grado bajo a alto).
- 40 La Figura 31 muestra el análisis de la expresión de hBD-1 en tejido de próstata humano. Los niveles de expresión relativa de hBD-1 se compararon en muestras clínicas normales de pacientes que se sometieron a prostatectomías radicales. La línea discontinua sirve como un punto de referencia para comparar valores obtenidos entre muestra macroscópica y derivada de LCM y las puntuaciones de Gleason correspondientes se indican por encima de cada barra. La Figura 31A muestra los niveles de expresión de hBD-1 comparados en tejidos obtenidos mediante disección macroscópica. La Figura 31B muestra los niveles de expresión de hBD-1 comparados en tejido obtenidos mediante microdissección de captura con láser.
- 45 La Figura 32 muestra el análisis de la expresión de hBD-1 en líneas celulares de próstata. La Figura 32A muestra los niveles de expresión de hBD-1 comparados con respecto a células hPrEC en líneas celulares de cáncer de próstata antes y después de la inducción de hBD-1. Un asterisco representa niveles de expresión estadísticamente superiores en comparación con hPrEC. Los dobles asteriscos representan niveles de expresión estadísticamente significativos en comparación con la línea celular antes de la inducción de hBD-1 (ensayo t de Student, $p < 0,05$). La Figura 32B muestra la expresión de hBD-1 ectópica verificada en la línea celular de cáncer de próstata DU145 mediante inmunocitoquímica. Las células de hPrEC se tiñeron para hBD-1 como un control positivo (a: DIC y b: fluorescencia). Las células DU145 se transfecaron con hBD-1 y se indujeron durante 18 h (c: DIC y d: fluorescencia). Barra de tamaño: 20 μm .
- 50
- 55
- 60
- 65

La Figura 33 muestra el análisis de la citotoxicidad de hBD-1 en células de cáncer de próstata. Las líneas celulares de próstata DU145, PC3, PC3/AR+ y LNCaP se trataron con Pon A para inducir la expresión de hBD-1 durante 1-3 días después de lo cual se realizó el ensayo de MTT para determinar la viabilidad celular. Cada barra representa la media ± E.T.M. de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

La Figura 34 muestra el análisis de QRT-PCR de la expresión de hBD-1 y cMYC en secciones tisulares de próstata humana de LCM de normal, PIN y tumor. La expresión para cada gen se presenta como proporciones de expresión en comparación con β-actina. La Figura 35A muestra la comparación de los niveles de expresión de hBD-1 en secciones normales, PIN y tumorales. La Figura 35B muestra la comparación del nivel de expresión de cMYC en secciones normales, de PIN y tumorales.

La Figura 35 muestra el análisis de QRT-PCR de la expresión de hBD-1 después de la anulación de PAX2 con ARNip. Los niveles de expresión de hBD-1 se presentan como proporciones de expresión en comparación con β-actina. Un asterisco representa niveles de expresión estadísticamente superiores en comparación con la línea celular antes de tratamiento con ARNip de PAX2 (ensayo t de Student p < 0,05).

La Figura 36 muestra el silenciamiento de la expresión de proteína de PAX2 después de tratamiento con ARNip de PAX2. La Figura 37A muestra la expresión de PAX2 examinada mediante análisis de transferencia de Western en células primarias de próstata de HPrEC (carril 1) y en células de cáncer de próstata DU145 (carril 2), PC3 (carril 3) y LNCaP (carril 4). Las transferencias se separaron y se re-sondaron para -actina como un control interno para garantizar una carga igual. La Figura 37B muestra el análisis de transferencia de Western de DU145, PC3 y LNCaP confirmaron todos la anulación de la expresión de PAX2 después de la transfección con dúplex de ARNip de PAX2. De nuevo, las transferencias se separaron y se re-sondaron para β-actina como un control interno.

La Figura 37 muestra el análisis del crecimiento de células de cáncer de próstata después del tratamiento con ARNip de PAX2. El análisis microscópico de contraste de fases de HPrEC (A), LNCaP (C), DU145 (E) y PC3 (G) a los 6 días en presencia de ARNip no específico de control negativo. Había una reducción significativa en el número de células en DU145 (D), PC3 (F) y LNCaP (H) después del tratamiento con ARNip de PAX2. Sin embargo, no parecía haber ningún efecto en HPrEC (B). Barra = 20 µm.

La Figura 38 muestra el análisis de la muerte celular después del silenciamiento con ARNip de PAX2. Las líneas celulares de cáncer de próstata PC3, DU145 y LNCaP se trataron con ARNip de PAX2 o ARNip de control negativo no específicos durante 2, 4 o 6 días después de lo cual se realizó el ensayo de MTT. La anulación de PAX2 dio como resultado una disminución en la viabilidad celular relativa en las tres líneas. Los resultados representan la media ± D.T. n =9.

La Figura 39 muestra el análisis de la actividad de caspasa. Las células DU145, PC3 y LNCaP se tiñeron con fluorometilcetona marcada con carboxifluoresceína para detectar la actividad de caspasa después del tratamiento con ARNip de PAX2. El análisis con fluorescencia no mostró tinción de caspasa en DU145 (A), células PC3 (C) y células LNCaP (E) de control. Sin embargo, las células tratadas con ARNip de PAX2 indujeron actividad de caspasa en DU145 (B), PC3 (D) y LNCaP (F). Barra = 20 µm.

La Figura 40 muestra el análisis de factores apoptóticos después de tratamiento con ARNip de PAX2. Los cambios en la expresión de los factores pro-apoptóticos se compararon en células de control no tratadas y en células tratadas durante 6 días con ARNip de PAX2. La Figura 41A muestra que la expresión de BAD aumentó en DU145, PC3 y LNCaP después de la anulación de PAX2. La Figura 41B muestra que los niveles de expresión de BID aumentaron en LNCaP y DU145, pero no en células PC3. La Figura 41C muestra que la expresión de AKT disminuyó en LNCaP y DU145. Sin embargo, no hubo ningún cambio en la expresión de AKT en células PC3 después de la anulación de PAX2. Los resultados representan la media ± D.T., n =9. Los asteriscos representan las diferencias estadísticas (p < 0,05).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0007] El método y composiciones descritos pueden entenderse más fácilmente por referencia a la siguiente descripción detallada de realizaciones particulares y los Ejemplos incluidos en su interior y a las Figuras y a su descripción anterior y siguiente.

60 [0008] Se describen materiales, composiciones y componentes que pueden usarse para, pueden usarse junto con, pueden usarse en preparación para, o son productos de los métodos y composiciones descritos. Estos y otros materiales se describen en la presente memoria y se entiende que cuando se describen las combinaciones, subconjuntos, interacciones, grupos, etc. de estos materiales que aunque no se describa de forma explícita referencia específica de cada una de las combinaciones individuales y colectivas diversas y permutación de estos 65 compuestos, cada una se contempla y se describe específicamente en la presente memoria. Por ejemplo, si un

péptido se describe y se analiza y se analizan diversas modificaciones que pueden realizarse con respecto a diversas moléculas incluyendo el péptido, todas y cada una de las combinaciones y permutaciones del péptido y las modificaciones que son posibles se contemplan específicamente a menos que se indique específicamente lo contrario. Por tanto, si se describen una clase de moléculas A, B y C así como una clase de moléculas D, E y F y un ejemplo de una molécula de combinación, A-D se describe, entonces incluso si cada uno no se indica individualmente, cada uno se contempla individual y colectivamente. Por tanto, en este ejemplo, cada una de las combinaciones A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-D, C-E y C-F se contemplan específicamente y deben considerarse descritas a partir de la descripción de A, B y C; D, E y F; y la combinación del ejemplo A-D. Del mismo modo, también se contemplan y describen específicamente cualquier subconjunto o combinación de estos. Por tanto, por ejemplo, el subgrupo de A-E, B-F y C-E se contempla específicamente y debe considerarse descrito a partir de la descripción de A, B, y C; D, E y F; y la combinación del ejemplo A-D. Este concepto se aplica a todos los aspectos de esta solicitud incluyendo, pero sin limitación, etapas en métodos de preparación y uso de las composiciones descritas. Por tanto, si hay una variedad de etapas adicionales que puedan realizarse se entiende que cada una de estas etapas adicionales puede realizarse con cualquier realización o combinación de realizaciones específicas de los métodos descritos y que cada dicha combinación se contempla específicamente y debe considerarse descrita.

[0009] Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán deducir usando no más que experimentación rutinaria, muchos equivalentes con respecto a las realizaciones específicas del método y composiciones descritos en la presente memoria. Dichos equivalentes pretenden incluirse mediante las siguientes reivindicaciones.

[0010] Se entiende que el método y composiciones descritos no se limitan a la metodología particular, protocolos y reactivos descritos ya que estos pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente memoria es con el único propósito de describir realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención que únicamente limitarán las reivindicaciones adjuntas.

A. Diagnóstico, Tratamiento y Prevención del Cáncer de Próstata

[0011] En la presente memoria se describen composiciones y métodos para el diagnóstico, prevención y tratamiento del cáncer de próstata y de la neoplasia intraepitelial de la próstata (PIN).

1. Cáncer de Próstata

[0012] El carcinoma de próstata se ha convertido en una enfermedad significativa en muchos países y es el tumor más comúnmente diagnosticado en hombres en occidente, aumentando su aparición significativamente con la edad.

Este aumento y las muertes recientes de muchos personajes conocidos de cáncer de próstata han servido para destacar la necesidad de hacer algo sobre este cáncer. Se ha sugerido que la disponibilidad de exploración más amplia puede limitar la mortalidad del cáncer de próstata.

[0013] La exploración del cáncer de próstata actualmente consiste en un examen rectal y medición de los niveles de antígeno específico de próstata (PSA). Estos métodos carecen de especificidad ya que el examen rectal digital presenta una considerable variabilidad entre examinadores y los niveles de PSA pueden ser elevados en hiperplasia prostática benigna (BHP), inflamación prostática y otras afecciones. El fracaso comparativo del PSA como un ensayo de diagnóstico se observó en 366 hombres que desarrollaron cáncer de próstata que estaban incluidos en el Physicians Health Study, un estudio prospectivo de más de 22.000 hombres. Los niveles de PSA se midieron en suero, que se conservó al inicio del estudio y solo se encontraron niveles elevados en 47% de hombres que desarrollaban cáncer de próstata los siguientes cuatro años (Gann *et al.*, 1995).

[0014] Los cánceres de próstata pueden clasificarse usando el sistema de Gleason, como conocen bien los expertos en la técnica (Gleason *et al.* 1996). Este sistema utiliza arquitectura tisular en lugar de características citológicas. Se usa una graduación de 1 a 5 (de bien a poco diferenciado), y la puntuación combinada de las áreas más frecuentes y más graves de la lesión se combinan. La clasificación de Gleason proporciona información de pronóstico que puede ser valiosa además de la valoración del estadio del tumor (estadificación). La puntuación de Gleason de 2 a 4 y de 8 a 10 tiene buen valor predictivo, pero aproximadamente tres cuartos de tumores tienen valores intermedios.

[0015] Se usan dos sistemas principales para estadificar el cáncer de próstata: TNM y el sistema Jewett (Benson & Olsson, *et al.* 1989). La estadificación tiene en cuenta cualquier propagación metastásica del tumor y es difícil, porque es difícil evaluar la implicación de los ganglios linfáticos locales o invasión local. El tamaño del tumor es también difícil de medir ya que el tejido tumoral no puede diferenciarse macroscópicamente del tejido prostático normal, y porque la glándula prostática carece de una cápsula distinta y está rodeada por una capa de tejido graso fibroso.

[0016] Cuatro categorías describen el estado de tumor de próstata (T), que varía de T1 a T4. Para T1, el cáncer es microscópico, unilateral y no palpable. El médico no puede notar el tumor u observarlo con formación de imágenes tal como ultrasonido transrectal. El tratamiento para BPH puede haber descrito la enfermedad o se confirmó a través del uso de una biopsia a través de aguja realizada debido a un PSA elevado. Para T2, el médico puede notar el

cáncer con una DRE. Parece que la enfermedad está confinada a la glándula prostática en uno o ambos lados de la glándula. Para T3, el cáncer ha avanzado al tejido inmediatamente externo de la glándula. Para T4, el cáncer se ha propagado a otras partes del cuerpo.

- 5 [0017] Los métodos de exploración actuales son por lo tanto insatisfactorios; no hay un método fiable para el diagnóstico del cáncer o predecir o prevenir su posible propagación metastásica, que es la principal causa de muerte en la mayoría de los pacientes.

2. PAX2

10

- [0018] Los genes pax son una familia de nueve genes que controlan el desarrollo que codifican factores de transcripción nucleares. Estos desempeñan una función importante en la embriogénesis y se expresan en un modelo temporal y espacial muy ordenado. Todos ellos contienen una región "de caja emparejada" de 384 pares de bases que codifican un dominio de unión a ADN que está altamente conservado a lo largo de la evolución (Stuart, ET, et al. 15 1994). La influencia de genes Pax sobre los procesos de desarrollo se ha demostrado mediante numerosos síndromes naturales de ratón y humanos que pueden atribuirse directamente a incluso una insuficiencia heterocigota en un gen Pax. Se proporciona una secuencia de PAX2 en Dressler, et al. 1990. Ejemplos de cánceres en los que la expresión de PAX2 se ha detectado se indican en la Tabla 1.

20

Tabla 1: cánceres que expresan PAX2

Cánceres que expresan PAX2	Nuevos Casos Estimados en los Estados Unidos	Muertes Estimadas en los Estados Unidos	Nuevos Casos Globales Estimados	Muertes Globales Estimadas
Próstata	234.460	27.350	679.023	221.002
Mama	214.600	41.430	1.151.298	410.712
Ovario	20.180	15.310	204.500	124.860
Renal	38.890	12.840	208.479	101.895
Cerebro	12.820	18.820	189.485	141.650
De cuello uterino	9.710	3.700	493.243	273.505
Vejiga	61.420	13.060	356.556	145.009
Leucemia	35.020	22.280	300.522	222.506
Sarcoma de Kaposi	Datos No Disponibles	Datos No Disponibles	Datos No Disponibles	Datos No Disponibles
TOTAL (aprox.)	627.100	154.790	3.583.106	1.641.139

3. DEFB1

- [0019] Las beta-defensinas son péptidos catiónicos con amplio espectro de actividad antimicrobiana que son 25 productos de epitelios y leucocitos (Ganz y Weiss, 1997). Estos productos génicos simples de dos exones se expresan en las superficies epiteliales y se secretan en sitios que incluyen la piel (Harder et al., 1997), córnea (McNamara et al., 1999), lengua (Mathews et al., 1999, Jia et al., 2000), encías (Mathews et al., 1999; Krisanaprakomkit et al., 1998), glándulas salivales (Mathews et al., 1999), esófago (Jia et al., 2000), intestino (O'Neil et al., 1999), riñón (Valore et al., 1998; Zucht et al., 1998), tracto urogenital (Valore et al., 1998) y el epitelio 30 respiratorio (Bals et al., 1998; Goldman et al., 1997; McCray y Bentley. 1997). Hasta ahora, se han identificado cinco genes beta-defensina de origen epitelial y se han caracterizado en seres humanos: DEFB1 (Bensch et al., 1995), DEFB2 (Harder et al., 1997), DEFB3 (Harder et al., 2001; Jia et al., 2001), DEFB4 y HE2/EP2.

- [0020] La estructura primaria de cada producto génico de beta-defensina se caracteriza por un motivo de seis 35 cisteínas de pequeño tamaño, carga catiónica elevada y exquisita diversidad más allá de estas características. El rasgo más característico de las proteínas de defensina es su motivo de seis cisteínas que forman una red de tres enlaces disulfuro. Los tres enlaces disulfuro en las proteínas beta-defensina se encuentran entre C₁-C₅, C₂-C₄ y C₃-C₆. La distancia más común entre los restos de cisteína adyacentes es de 6, 4, 9, 6, 0. La distancia entre las cisteínas en las proteínas beta-defensina puede variar en uno o dos aminoácidos excepto para C₅ y C₆, localizado 40 cerca del extremo carboxilo. En todos los genes beta-defensina conocidos de vertebrados, estos dos restos de cisteína son adyacentes entre sí.

- [0021] Un segundo rasgo de las proteínas beta-defensina es su pequeño tamaño. Cada gen beta-defensina codifica 45 una prepro-proteína que varía de tamaño de 59 a 80 aminoácidos con un tamaño promedio de 65 aminoácidos. Este producto génico después se escinde mediante un mecanismo desconocido para crear el péptido maduro que varía de tamaño de 36 a 47 aminoácidos con un tamaño promedio de 45 aminoácidos. Las excepciones de estos intervalos son los productos génicos EP2/HE2 que contienen el motivo beta-defensina y se expresan en el epidídimo.

[0022] Un tercer rasgo de las proteínas beta-defensina es la alta concentración de restos catiónicos. La cantidad de restos cargados positivamente (arginina, lisina, histidina) en el péptido maduro varía de 6 a 14 con un promedio de 9.

5

[0023] El rasgo final de los productos génicos de beta-defensina es su estructura primaria diversa pero una conservación de estructura terciaria evidente. Debajo de las seis cisteínas, no se conservan aminoácidos sencillos en una posición determinada en todos los miembros conocidos de esta familia de proteínas. Sin embargo, existen posiciones que están conservadas que parecen ser importantes para las estructuras secundaria y terciaria y la función.

[0024] A pesar de la gran diversidad de la secuencia de aminoácidos primaria de las proteínas beta-defensina, los datos limitados sugieren que la estructura terciaria de esta familia de proteínas está conservada. El núcleo estructural es una lámina beta antiparalela tricatenaria, según se ilustra por las proteínas codificadas por BNBD-12 y DEFB2. Las tres cadenas beta están conectadas por un giro beta, y un bucle en horquilla alfa y la segunda cadena beta también contiene una protuberancia beta. Cuando estas estructuras se pliegan en su estructura terciaria apropiada, la secuencia aparentemente al azar de restos catiónicos e hidrófobos se concentra en dos caras de una proteína globular. Una cara es hidrófila y contiene muchas cadenas laterales cargadas positivamente y la otra es hidrófoba. En solución, la proteína HBD-2 codificada por el gen DEFB2 muestra un segmento alfa helicoidal cerca del extremo N no previamente adscrito a estructuras en solución de alfa-defensinas o a la beta-defensina BNBD-12. Los aminoácidos cuyas cadenas laterales se dirigen hacia la superficie de la proteína están menos conservados entre las proteínas beta-defensina mientras que los restos de aminoácidos en las tres cadenas beta de la lámina núcleo beta están más altamente conservados.

25 **[0025]** Los péptidos de beta-defensina se producen como pre-pro-péptidos y después se escinden para liberar un fragmento peptídico activo C-terminal sin embargo, las rutas para el procesamiento intracelular, conservación y liberación de los péptidos beta-defensina humanos en el epitelio de las vías respiratorias son desconocidas.

4. Diagnóstico

30

[0026] Una ventaja clave de la presente explicación es que en la presente memoria se describen métodos que consiguen un proceso más rápido y simplificado para identificar a partir de un tejido o líquido corporal un sujeto que padece o está en riesgo de padecer cáncer de próstata.

35 **[0027]** Por tanto, los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender la detección, incluyendo la medición, de PAX2 y/o DEFB1 en un tejido del sujeto, tal como una muestra de biopsia de la próstata. La biopsia de próstata es un procedimiento en el que se extirpan pequeñas muestras de una glándula de próstata de hombre a ensayar para determinar la presencia de cáncer. Típicamente se realiza cuando las puntuaciones de un ensayo de sangre PSA dan lugar a un nivel que está asociado con la posible presencia de cáncer de próstata.

40

[0028] Los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender la detección, incluyendo la medición de PAX2 y/o DEFB1 en una célula del sujeto, tal como una célula de la próstata del sujeto.

45 **[0029]** Además, los métodos descritos en la presente memoria pueden comprender la detección, incluyendo la medición, de PAX2 y/o DEFB1 en líquidos corporales del sujeto, tal como sangre, orina, plasma, suero, lágrimas, linfa, bilis, líquido cefalorraquídeo, líquido intersticial, humor acuoso o vítreo, calostro, esputo, líquido amniótico, saliva, secreciones anales y vaginales, sudoración, semen, trasudado, exudado y fluido sinovial. El plasma sanguíneo es el componente líquido de la sangre, en el que se suspenden las células sanguíneas. El plasma es el componente de la sangre más sencillo, constituyendo aproximadamente 55% del volumen sanguíneo total. El suero 50 se refiere al plasma sanguíneo en el que se han eliminado factores de coagulación (tales como fibrina). El plasma sanguíneo contiene muchas proteínas vitales incluyendo fibrinógeno, globulinas y albúmina de suero humana. Algunas veces el plasma humano puede contener impurezas virales que deben extraerse mediante un proceso viral.

55 **[0030]** La identificación de marcadores de proteínas en sangre puede proporcionar un diagnóstico más preciso o precoz del cáncer que tiene un impacto positivo sobre el tratamiento y control del cáncer. Como se describe en la presente memoria, la expresión aberrante de PAX2 se produce precozmente en la progresión de cáncer y puede ser un suceso de iniciación en la tumorogénesis. Por lo tanto, pueden usarse muestras de pacientes recogidas para explorar la presencia de proteínas o antígenos PAX2 para la detección precoz del cáncer.

60 **[0031]** Adicionalmente, la incorporación de la exploración de PAX2 puede proporcionar a los especialistas clínicos un pronosticador para tejido iniciado o precanceroso. Los candidatos para este ensayo incluyen pacientes en alto riesgo (basándose en edad, raza) para cáncer. Como un diagnóstico, después puede realizarse un ensayo PAX2 positivo por exploración adicional con un biomarcador para determinar el sitio del cáncer. Además, estos pacientes pueden ser candidatos para inhibidores de PAX2 para quimioprevisión para sus cánceres. Como alternativa, este

ensayo puede usarse en pacientes como una medición de la eficacia de su terapia contra el cáncer o para controlar la reaparición del cáncer.

[0032] Como otro ejemplo, pacientes que presentan indicadores con potencial de cáncer tales como la detección de 5 nódulos en la próstata durante un examen rectal digital realizado por el médico o aquellos que experimentan una subida rápida en PSA a menudo están en el estado "Espera Expectante". A menudo es difícil considerar si estos pacientes tienen o desarrollarán cáncer. La detección de PAX2 en muestras, tales como plasma/suero de estos pacientes puede usarse para ayudar en la decisión de obtener una biopsia en hombres en los que se sospecha cáncer de próstata, que puede conducir a una reducción en la cantidad de biopsias prostáticas innecesarias y una 10 intervención precoz de su enfermedad.

[0033] También se proporciona en la presente memoria un método de diagnóstico de cáncer de próstata en un sujeto, que comprende detectar en células procedentes de la próstata del sujeto niveles de PAX2 y beta defensina-1 (DEFB1), en el que la proporción de PAX2 con respecto a DEFB1 es de al menos aproximadamente 100:1. 15

[0034] En la presente memoria también se proporciona un método de diagnóstico de neoplasia intraepitelial de próstata (PIN) en un sujeto, que comprende detectar en células procedentes de la próstata del sujeto niveles de PAX2 y beta defensina-1 (DEFB1), en el que la proporción de PAX2 con respecto a DEFB1 es al menos aproximadamente 40:1 y menos de aproximadamente 100:1. 20

[0035] En la presente memoria también se proporciona un método para identificar un sujeto que tiene una próstata normal, que comprende detectar en células procedentes de la próstata del sujeto niveles de PAX2 y beta defensina-1 (DEFB1), en el que la proporción de PAX2 con respecto a DEFB1 es menos de aproximadamente 40:1. 25

[0036] En la presente memoria también se proporciona un método para diferenciar entre afecciones de la próstata normales, precancerosas y cancerosas en un sujeto, que comprende detectar en células procedentes de la próstata del sujeto niveles de PAX2 y beta defensina-1 (DEFB1). En algunos aspectos, en los que la proporción de PAX2 con respecto a DEFB1 es menos de aproximadamente 40:1, se detecta un estado de próstata normal. En algunos aspectos, cuando la proporción de PAX2 con respecto a DEFB1 es al menos aproximadamente 40:1 y menos de 30 aproximadamente 100:1, se detecta un estado precanceroso. En algunos aspectos, cuando la proporción de PAX2 con respecto a DEFB1 es al menos aproximadamente 100:1, se detecta una próstata cancerosa.

5. Diagnóstico y Tratamiento

[0037] En la presente memoria también se proporciona un método para diagnosticar y tratar el cáncer de próstata en un sujeto, que comprende detectar en células procedentes de la próstata del sujeto niveles de PAX2 y beta defensina-1 (DEFB1), en el que la proporción de PAX2 con respecto a DEFB1 es al menos aproximadamente 100:1, que adicionalmente comprende el tratamiento de dicho sujeto. 35

[0038] En la presente memoria también se proporciona un método para diagnosticar y tratar neoplasia intraepitelial de próstata (PIN) en un sujeto, que comprende detectar en células procedentes de la próstata del sujeto niveles de PAX2 y beta defensina-1 (DEFB1), en el que la proporción de PAX2 con respecto a DEFB1 es al menos de aproximadamente 40:1 y menos de aproximadamente 100:1, que comprende adicionalmente el tratamiento de dicho sujeto. 40

[0039] Como se usa en los métodos descritos el tratamiento para el cáncer de próstata puede implicar la espera expectante, cirugía, terapia de radiación, ultrasonido focalizado de alta intensidad (HIFU), quimioterapia, criocirugía, terapia hormonal o alguna combinación. Qué opción es mejor depende de la fase de la enfermedad, la puntuación de Gleason y el nivel de PSA. Otros factores de importancia son la edad del hombre, su salud general y sus 45 sensaciones sobre los posibles tratamientos y sus posibles efectos secundarios.

[0040] Si el cáncer se ha propagado más allá de la próstata, las opciones del tratamiento cambian significativamente, de manera que la mayoría de los médicos que tratan el cáncer de próstata utilizan una diversidad de nomogramas para predecir la probabilidad de la propagación. En el tratamiento por espera expectante, HIFU, 55 terapia por radiación, criocirugía y cirugía generalmente se ofrecen a hombres cuyo cáncer permanece dentro de la próstata. La terapia hormonal y quimioterapia a menudo se reservan para enfermedades que se han propagado más allá de la próstata. Sin embargo, existen excepciones; la radioterapia puede usarse para algunos tumores avanzados y la terapia hormonal se usa para algunos tumores de estadio precoz. La crioterapia, terapia hormonal y quimioterapia también pueden ofrecerse si el tratamiento inicial falla y el cáncer avanza.

[0041] La espera expectante, denominada también "vigilancia activa", se refiere a la observación y monitorización regular sin tratamiento invasivo. La espera expectante a menudo se usa cuando se encuentra un cáncer de próstata de crecimiento lento, de estadio precoz en un hombre de edad avanzada. La espera expectante también puede sugerirse cuando el riesgo de cirugía, radioterapia o terapia hormonal superan los posibles beneficios. Otros 60 tratamientos pueden iniciarse si los síntomas se desarrollan o si estos son síntomas de que el cáncer se desarrolla

aceleradamente (por ejemplo, produciendo rápidamente PSA, aumentando la puntuación Gleason sobre biopsia repetida, etc.). La mayoría de los hombres que eligen la espera expectante para tumores en estado precoz eventualmente presentan síntomas de progresión tumoral y puede ser necesario comenzar tratamiento a los tres años.

5

- [0042]** La extracción quirúrgica de la próstata o prostatectomía, es un tratamiento común bien para el cáncer de próstata de estado precoz o para cáncer que no ha respondido a radioterapia. El tipo más común es la prostatectomía retropública radical, en la que el cirujano extirpa la próstata mediante una incisión abdominal. Otro tipo es la prostatectomía perineal radical, en la que el cirujano extirpa la próstata a través de una incisión en el perineo, la piel entre el escroto y el ano. La prostatectomía radical también puede realizarse laparoscópicamente, mediante una serie de pequeñas incisiones (1 cm) en el abdomen, con o sin ayuda de un robot quirúrgico.

- 10 **[0043]** La prostatectomía radical es muy eficaz para tumores que no se han propagado más allá de la próstata. Las tasas de curación dependen de factores de riesgo tales como el nivel de PSA y el grado Gleason. Sin embargo, pueden ocasionar lesión nerviosa que altera significativamente la calidad de vida del superviviente de cáncer de próstata. Pueden usarse medicaciones tales como sildenafil (Viagra), tadalafil (Cialis) o vardenafil (Levitra) para restablecer algún grado de potencia. Para la mayoría de los hombres con enfermedad órgano-confinada, una técnica más limitada de "moderación nerviosa" puede ayudar a impedir la incontinencia urinaria y la impotencia.

- 15 **[0044]** La prostatectomía radical se ha usado tradicionalmente en solitario cuando el cáncer es pequeño. En el caso de márgenes positivos o encontrar una enfermedad localmente avanzada sobre la patología, la radioterapia adyuvante puede ofrecer una cirugía mejorada. La cirugía también puede ofrecerse cuando un cáncer no responde a radioterapia. Sin embargo, como la radioterapia ocasiona cambios tisulares, la prostatectomía después de radiación tiene un mayor riesgo de complicaciones.

25

- [0045]** La resección transuretral de la próstata, comúnmente denominada "TURP", es un procedimiento quirúrgico realizado cuando el tubo de la vejiga al pene (uretra) se bloquea por un agrandamiento de la próstata. La TURP es generalmente para enfermedades benignas y no significa un tratamiento definitivo para el cáncer de próstata. Durante una TURP, un pequeño tubo (cistoscopio) se coloca en el pene y el bloqueo de la próstata se secciona.

30

- [0046]** En enfermedades metastásicas, en las que el cáncer se ha propagado más allá de la próstata, la extirpación de los testículos (denominada orquiectomía) puede realizarse para disminuir los niveles de testosterona y controlar el crecimiento del cáncer.

- 35 **[0047]** La braquiterapia para el cáncer de próstata se administra usando "semillas", varillas pequeñas radiactivas implantadas directamente en el tumor. La terapia con radiación, conocida también como radioterapia, utiliza rayos Gamma para destruir las células cancerosas de la próstata. Se usan dos tipos de terapia por radiación diferentes en el tratamiento contra el cáncer de próstata; terapia con radiación de haces externos y braquiterapia,

- 40 **[0048]** La terapia con radiación de haces externos usa un acelerador lineal para producir rayos Gamma de alta energía que se dirigen en un haz hacia la próstata. Una técnica denominada terapia por radiación de intensidad modulada (IMRT) puede usarse para ajustar el haz de radiación para conformar con la forma del tumor, permitiendo proporcionar mayores dosis a la próstata y vesícula seminal con un menor daño a la vejiga y recto. La terapia con radiación de haces externa se proporciona generalmente durante varias semanas, con visitas diarias a un centro de 45 radioterapia.

- 45 **[0049]** La terapia con radiación de haz externo para el cáncer de próstata se administra mediante un acelerador lineal tal como este. La braquiterapia implica la colocación de aproximadamente 100 "semillas" que contienen material radiactivo (tal como yodo-125 o paladio-103) con una aguja a través de la piel del perineo directamente en el tumor. Estas semillas emiten rayos X de menor energía que solamente son capaces de desplazarse a corta distancia. Las semillas de braquiterapia permanecerán en la próstata permanentemente, aunque los hombres con semillas implantadas no están en riesgo de exponer a otros a radiación.

- 50 **[0050]** La terapia con radiación se usa normalmente en el tratamiento para el cáncer de próstata. Esta puede usarse en lugar de cirugía para cánceres precoces y también puede usarse en fases avanzadas de cáncer de próstata para tratar metástasis ósea dolorosa. Los tratamientos con radiación también pueden combinarse con terapia hormonal para enfermedades de riesgo intermedio, en las que la terapia con radiación en solitario es probablemente menos curativa para el cáncer. La radiación de haz externo puede combinarse con braquiterapia para situaciones de intermedias a alto riesgo. También se considera una combinación de "triple modalidad" de terapia con radiación de 55 haz externo, braquiterapia y terapia hormonal.

- 55 **[0051]** La terapia con radiación se ofrece frecuentemente a hombres cuyos problemas médicos hacen que la cirugía sea más arriesgada. La terapia con radiación parece curar pequeños tumores que están confinados en la próstata aproximadamente casi tan bien como cirugía. Sin embargo, hasta 2006 algunas cuestiones permanecen sin

resolver, tales como si la radiación debe proporcionarse al resto de la pelvis, cuánta dosis debe absorberse y si la terapia hormonal debe proporcionarse al mismo tiempo.

[0052] La criocirugía es otro método para el tratamiento del cáncer de próstata. Esta es menos invasiva que la prostatectomía radical y se usa menos habitualmente anestesia general. Bajo guía ecográfica, se insertan varillas metálicas a través de la piel del perineo dentro de la próstata. Para enfriar las varillas se usa nitrógeno líquido, que congela el tejido circundante a -196 °C (-320 °F). Dado que el agua dentro de las células de la próstata se congela, las células mueren. La uretra se protege de la congelación mediante un catéter lleno con líquido caliente. La criocirugía generalmente produce menos problemas con el control urinario que otros tratamientos, pero se produce impotencia hasta 90% del tiempo.

[0053] La terapia hormonal usa mediaciones o cirugía para bloquear que las células del cáncer de próstata adquieran dihidrotestosterona (DHT), una hormona producida en la próstata y necesaria para el crecimiento y propagación de la mayoría de las células cancerosas de la próstata. El bloqueo de la DHT frecuentemente produce que el cáncer de próstata detenga el crecimiento e incluso se reduzca. Sin embargo, la terapia hormonal raramente cura el cáncer de próstata porque cánceres que inicialmente responden a terapia hormonal típicamente se vuelven resistentes después de uno o dos años. Por lo tanto la terapia hormonal se usa normalmente cuando el cáncer se ha propagado desde la próstata. También puede proporcionarse a hombres que se someten a terapia con radiación o cirugía para ayudar a impedir la reaparición de su cáncer.

[0054] La terapia hormonal para el cáncer de próstata dirige las rutas que utiliza el cuerpo para producir DHT. Un bucle de retroalimentación que implica los testículos, hipotálamo y las glándulas hipofisis, adrenal y prostática controla los niveles en sangre de la DHT. En primer lugar, bajos niveles en sangre de DHT estimulan al hipotálamo para producir la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). La GnRH estimula después la glándula hipofisis para producir la hormona luteinizante (LH), y la LH estimula a los testículos a producir testosterona. Finalmente, la testosterona de los testículos y la deshidroepiandrosterona de las glándulas adrenales estimulan la próstata para producir más DHT. La terapia hormonal puede disminuir los niveles de DHT interrumpiendo esta ruta en cualquier momento.

[0055] La orquiectomía es una cirugía para extirpar los testículos. Dado que los testículos fabrican la mayoría de la testosterona del organismo, tras la orquiectomía los niveles de testosterona descenden. Ahora la próstata no solo carece de estímulos de testosterona para producir DHT, sino que tampoco tiene suficiente testosterona para transformar en DHT.

[0056] Los antiandrógenos son medicaciones tales como flutamida, bicalutamida, nilutamida y acetato de ciproterona que directamente bloquean las acciones de testosterona y DHT en las células de cáncer de próstata.

[0057] Las medicaciones que bloquean la producción de andrógenos adrenales tales como DHEA incluyen ketoconazol y aminoglutetimida. Dado que las glándulas adrenales solo fabrican aproximadamente 5% de los andrógenos del cuerpo, estas medicaciones se usan generalmente solo en combinación con otros métodos que pueden bloquear 95% de los andrógenos fabricados por los testículos. Estos métodos combinados se denominan bloqueo androgénico total (TAB). El TAB también puede conseguirse usando antiandrógenos.

[0058] La acción de GnRH puede interrumpirse en una de dos maneras. Los antagonistas de GnRH suprimen la producción de GnRH directamente, mientras que los agonistas de GnRH suprimen GnRH a través del proceso de regulación por disminución después de un efecto de estimulación inicial. Abarelix es un ejemplo de un antagonista de GnRH, mientras que los agonistas de GnRH incluyen leuprolida, goserelina, triptorelina y buserilina. Inicialmente, estas medicaciones aumentan la producción de LH. Sin embargo, debido a que el aporte constante de la medicación no se ajusta al ritmo de producción natural del organismo, la producción tanto de LH como de GnRH disminuye después de algunas semanas. IT

6. Tratamiento/ Prevención

[0059] A modo de ejemplo pero no en el ámbito de la invención existen métodos de prevención de cáncer de próstata en un sujeto, que comprenden administrar a un sujeto diagnosticado con neoplasia intraepitelial de próstata (PIN) una composición que comprende un inhibidor de la expresión o actividad de PAX2. Las "actividades" de una proteína incluyen, por ejemplo, la transcripción, traducción, translocación intracelular, secreción, fosforilación por quinasas, escisión por proteasas, unión homófila y heterófila a otras proteínas, ubiquitinación. En algunos aspectos, "actividad PAX2" se refiere específicamente a la unión de PAX2 con el promotor de DEFB-1. En la presente memoria también se proporciona un método de prevención del cáncer de próstata en un sujeto que comprende diagnosticar a un sujeto con neoplasia intraepitelial de próstata (PIN) y administrar al sujeto una composición que comprende un inhibidor de la expresión o actividad de PAX2. El sujeto puede diagnosticarse con PIN detectando en células de la próstata del sujeto los niveles de PAX2 y beta defensina-1 (DEFB1), en la que la proporción PAX2 con respecto a DEFB1 es al menos aproximadamente 40:1 y menos de aproximadamente 100:1.

[0060] En algunos aspectos, PAX2 se regula positivamente en la etapa de atrofia antes de PIN. Por tanto, también se proporciona un método de prevención de cáncer de próstata en un sujeto, que comprende detectar en células de la próstata del sujeto niveles de PAX2 y beta defensina-1 (DEFB1), en la que la proporción de PAX2 con respecto a DEFB1 es al menos aproximadamente 40:1 y menos de aproximadamente 100:1, y administrar al sujeto una
5 composición que comprende un inhibidor de la expresión o actividad de PAX2.

[0061] A modo de ejemplo pero no en el ámbito de la invención existen métodos para el tratamiento de neoplasia intraepitelial de próstata (PIN) en un sujeto, que comprende diagnosticar a un sujeto con PIN y administrar al sujeto una composición que comprende un inhibidor de la expresión o actividad de PAX2. El sujeto puede diagnosticarse
10 con PIN detectando en células de la próstata del sujeto niveles de PAX2 y beta defensina-1 (DEFB1), en la que la proporción de PAX2 con respecto a DEFB1 es al menos aproximadamente de 40:1 y menos de aproximadamente 100:1.

[0062] A modo de ejemplo pero no en el ámbito de la invención se encuentran métodos de tratamiento o prevención
15 de neoplasia intraepitelial de próstata (PIN) en un sujeto, que comprende detectar en células de la próstata del sujeto niveles de PAX2 y beta defensina-1 (DEFB1), en la que la proporción de PAX2 con respecto a DEFB1 es al menos aproximadamente de 40:1 y menos de aproximadamente 100:1, y administrar al sujeto una composición que comprenda un inhibidor de la expresión o actividad de PAX2.

20 **[0063]** A modo de ejemplo pero no en el ámbito de la invención se encuentran métodos de tratamiento de cáncer de próstata en un sujeto que comprenden diagnosticar a un sujeto con cáncer de próstata y administrar al sujeto una composición que comprende un inhibidor de la expresión o actividad de PAX2. El sujeto puede diagnosticarse con cáncer de próstata detectando en células de la próstata del sujeto niveles de PAX2 y beta defensina-1 (DEFB1), en la que la proporción de PAX2 con respecto a DEFB1 es al menos aproximadamente 100:1.

25 **[0064]** El inhibidor de los métodos descritos puede ser un antagonista selectivo de angiotensina II. El inhibidor de los métodos descritos puede ser un antagonista selectivo de la enzima convertidora de angiotensina (ACE). Por ejemplo, el inhibidor puede ser enalapril. El inhibidor puede ser un antagonista selectivo del receptor de angiotensina II de tipo 1 (AT1R). Por ejemplo el inhibidor puede ser valsartan, olmesartan o telmisartan. El inhibidor puede ser un
30 antagonista selectivo de MEK. El inhibidor puede ser un antagonista selectivo de ERK1,2. El inhibidor puede ser un antagonista selectivo de STAT3. El inhibidor puede ser un antagonista selectivo de PAX2. El inhibidor puede bloquear la unión de PAX2 al promotor de beta defensina-1 (DEFB1). En algunos aspectos, el inhibidor descrito de la expresión o actividad de PAX2 no es un antagonista del receptor AT1R.

35 **[0065]** Por "antagonista selectivo" se refiere a algo que se une directamente e inhibe la actividad de la diana. Las "actividades" de una proteína incluyen, por ejemplo, transcripción, traducción, translocación intracelular, secreción, fosforilación por quinasas, escisión por proteasas, unión homófila y heterófila a otras proteínas, ubiquitinización. Por tanto, por ejemplo un antagonista selectivo de una quinasa puede unirse a la quinasa e inhibir la fosforilación de la diana a la quinasa. Por tanto, por ejemplo, un antagonista selectivo de una quinasa puede unirse a la quinasa e
40 impedir la unión de la quinasa a su sustrato.

[0066] En la presente memoria también se proporciona un método para el tratamiento o prevención del cáncer de próstata en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una composición que comprende un antagonista selectivo de MEK y/o ERK1,2. Este también puede ser un método para inhibir la expresión de PAX2. En este método
45 al sujeto se le puede diagnosticar en primer lugar una afección pre-cancerosa (por ejemplo PIN) o cáncer.

[0067] El antagonista selectivo de MEK y/o ERK1,2 puede ser U0126. U0126 es un compuesto orgánico químicamente sintetizado que inicialmente se reconoció como un antagonista de AP-1 celular, y se encontró que era muy selectivo y un inhibidor muy potente de la cascada de Proteína Quinasa Activada por Mitógeno (MAPK)
50 inhibiendo sus activadores inmediatos aguas arriba, Proteína Quinasa Quinasa Activada por Mitógeno 1 y 2 (conocida también como MEK1 y MEK2, CI50: 70 y 60 nM respectivamente). U0126 inhibe la MEK1,2 tanto activa como inactiva, a diferencia de PD098059 que solo inhibe la activación de MEK inactiva. El bloqueo de la activación de MEK impediría la fosforilación aguas abajo de diversos factores que incluyen p62TCK (Elk-1), un inductor aguas arriba de c-Fos y c-Jun, componentes del complejo AP-1. La inhibición de la ruta MEK/ERK por U0126 también
55 impide todos los efectos de H-Ras y K-Ras oncogénicos, inhibe parte de los efectos desencadenados por factores de crecimiento y bloquea la producción de citocinas inflamatorias y metaloproteinasas de la matriz.

[0068] El antagonista selectivo de MEK y/o ERK1,2 puede ser PD98059. PD98059 (inhibidor de MEK1) se ha observado que actúa *in vivo* como un inhibidor altamente selectivo de la activación de MEK1 y la cascada MAP quinasa. PD98059 se une a las formas inactivas de MEK1 e impide la activación por activadores aguas arriba tales como c-Raf. PD98059 inhibe la activación de MEK1 y MEK2 con valores de CI50 de 4 µM y 50 µM, respectivamente.
60

[0069] En la presente memoria también se proporciona un método para el tratamiento o prevención del cáncer de próstata en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una composición que comprende un antagonista

selectivo de STAT3. Este es también un método de inhibición de la expresión de PAX2. En primer lugar en este método al sujeto se le puede diagnosticar un estado pre-cánceroso (por ejemplo, PIN) o cáncer.

5 [0070] Como se observa en la presente memoria, PAX2 inhibe la expresión de DEFB 1 y se observa que DEFB 1 tiene actividad destructora de células tumorales. Por tanto, se proporciona un método para el tratamiento de cáncer en un sujeto inhibiendo la expresión de PAX2. Un ejemplo de un cáncer tratado mediante el método de la presente invención es el cáncer de próstata. Los métodos de la presente invención son particularmente eficaces para el tratamiento de cáncer de próstata en fase tardía.

10 [0071] En los métodos de tratamiento del cáncer descritos, el método de inhibir la expresión de PAX2 puede ser por administración de un ácido nucleico que codifica un ARNip para PAX2. Dharmachon es una fuente comercial para tales ARNip.

[0072] Por ejemplo, el ARNip para su uso en los métodos puede comprender:

15 AUAGACUCGACUUGACUUUCUU (SEC ID Nº:2),
AUCUUCAUCACGUUUCUCUU (SEC ID Nº:4),
20 GUAAUCAGCAAUCUUGUCCUU (SEC ID Nº:6),
GAUUUGAUGUGCUCUGAUGUU (SEC ID Nº:8), o combinaciones de los mismos, que incluyen fragmentos de al menos 10 ácidos nucleicos y sus variantes conservativas.

25 [0073] Otros ejemplos de secuencias diana para moléculas que inhiben PAX2 incluyen:

Nº1 ACCCGACTATGTTGCCCTGG (SEC ID Nº:56),
Nº2 AAGCTCTGGATCGAGTCTTG (SEC ID Nº:57),
30 y Nº 4 ATGTGTCAGGCACACAGACG (SEC ID Nº:58). Se observó que el Nº4 inhibía PAX2 X2 (Davies *et al.*, Hum. Mol. Gen. Jan. 15, 13 (2); 235).

35 [0074] Otro documento (Muratovska *et al.*, Paired-Box genes are frequently expressed in cancer and often required for cancer cell survival Oncogene (2003) 22, 7989-7997) describe los siguientes ARNip: GUCGAGUCUAUCUGCAUCCTT (SEC ID Nº:59) y GGAUGCAGAUAGACUCGACTT (SEC ID Nº:60).

40 [0075] Para regular por disminución la expresión de Pax2, Fonsato *et al.* transfectaron células endoteliales derivadas de tumor con un vector PAX2 antisentido. Véase Fonsato V. *et al.* Am J Pathol. 2006; 168(2):706-1, que se incorpora en la presente memoria por referencia para su descripción de esta molécula. De manera similar, Hueber *et al.*, informan que el ADNC antisentido de PAX2 y el ARN de interferencia pequeño de PAX2 (100 nM) reducen la proteína PAX2 endógena. Véase Hueber *et al.* Kidney Int. 2006, que se incorpora en la presente memoria por instruir acerca del ARNip PAX2 y antisentido PAX2.

45 [0076] Inhibidores adicionales de la expresión de PAX2 o la unión de PAX2 al promotor de DEFB1 se proporcionan para aumentar la expresión de DEFB 1 en los métodos descritos en la presente invención. Por ejemplo, pueden diseñarse moléculas pequeñas y anticuerpos basándose en los estudios actuales para interferir con o inhibir la unión de PAX2 al promotor de DEFB 1.

50 [0077] Como se observa en la presente memoria, PAX2 inhibe la expresión de DEFB1 y se observa que DEFB1 tiene actividad destructora de células tumorales. Por tanto, también se proporciona un método de tratamiento del cáncer en un sujeto administrando DEFB1. Un ejemplo de un cáncer tratado por el método de la presente invención es cáncer de próstata.

55 [0078] De manera similar, se proporciona un método de tratamiento del cáncer en un sujeto aumentando la expresión de DEFB1 en el sujeto. Los métodos actuales de administrar o aumentar la expresión de DEFB1 son particularmente eficaces para el tratamiento del cáncer de próstata en fase tardía.

60 [0079] En una realización de los métodos de la invención para el tratamiento del cáncer administrando DEFB1 o aumentando la expresión de DEFB1 (por ejemplo, inhibiendo la expresión o la unión de PAX2), el sujeto es un sujeto al que se le ha diagnosticado cáncer de próstata. En una realización adicional de los métodos de la invención para el tratamiento del cáncer administrando DEFB1 o aumentando la expresión de DEFB1 (por ejemplo, inhibiendo la expresión o unión de PAX2), el sujeto es un sujeto al cual se le ha diagnosticado cáncer de próstata avanzado (estado tardío).

[0080] En el método en el que la expresión de DEFB1 está aumentada, esta puede estar aumentada bloqueando la unión de PAX2 al promotor de DEFB1. El bloqueo de la unión de PAX2 al promotor de DEFB1 puede ser por administración de un oligonucleótido que contenga el sitio de unión de ADN de PAX2 de DEFB1. Este oligonucleótido puede ser complementario a la secuencia de PAX2 que inhibe al promotor de DEFB1. Como alternativa, el oligonucleótido puede interaccionar con el PAX2 de una manera que inhiba la unión a DEFB1. Esta interacción puede basarse en la estructura tridimensional en lugar de la secuencia de nucleótidos primaria.

[0081] Las proteínas PAX son una familia de factores de transcripción conservadas durante la evolución y son capaces de unirse a secuencias de ADN específicas mediante dominios denominados "dominio emparejado" y un "homeodomino". El dominio emparejado (PD) es una secuencia consenso compartida por determinadas proteínas PAX (por ejemplo, PAX2 y PAX6). El PD dirige la unión de ADN de aminoácidos localizados en la hélice α3 formando un complejo ADN-Proteína. Para PAX2, los aminoácidos en el HD reconocen e interactúan específicamente con una secuencia núcleo de ADN CCTTG (SEC ID Nº:1). Los oligonucleótidos hasta y sobre pasando 64 bases de longitud, que incluyen esta secuencia o su complemento se espera que sean inhibidores.

[0082] Se investigó la especificidad de unión al ADN del dominio emparejado PAX-8. Los experimentos de selección de sitio indican que PAX-8 se une a una secuencia consenso de manera similar a las que se unen por PAX-2 y Pax-5. Cuando las secuencias consenso de diversos dominios emparejados se observan a la luz de recientes estudios estructurales que describen la interacción de ADN-dominio emparejado (Xu, et al. 1995), parece que los pares de bases que contactan en el surco menor están conservados, mientras que la mayoría de los pares de bases que contactan en el surco mayor no lo están. Por lo tanto una red de contactos de surco menor específicos es una característica común de las interacciones de ADN de dominio emparejado. La importancia funcional de tal red puede someterse satisfactoriamente a ensayo analizando el efecto de mutaciones basadas en consenso del sitio de unión de PAX2 al promotor de DEFB1.

[0083] El sitio de ADN de PAX2 de DEFB1 puede comprender la SEC ID Nº:1 (CCTTG).

[0084] El oligonucleótido que comprende el sitio de unión del ADN PAX2 de DEFB1 se selecciona del grupo que consiste en

[0085] X₁-CCTTG (SEC ID Nº:1)-X₂, en la que X₁ es de 1 a 35 nucleótidos flanqueantes contiguos de DEFB1 y X₂ es de 1 a 35 nucleótidos. Los nucleótidos pueden ser nucleótidos contiguos que flanquean normalmente el sitio de unión de ADN de PAX2 de DEFB1. Como alternativa, pueden no estar relacionados con DEFB1, y seleccionarse rutinariamente para evitar interferencias con la secuencia de reconocimiento.

[0086] Por ejemplo, los oligonucleótidos inhibidores pueden seleccionarse del grupo que consiste en:

CTCCCTTCAGTTCCGTCGAC (SEC ID Nº:9)
 40 CTCCCTTCACCTTGGTCGAC (SEC ID Nº:10)
 ACTGTGGCACCTCCCTCAGTTCCGTCGACGAGGTTGTGC (SEC ID Nº:12)
 ACTGTGGCACCTCCCTCACCTT GGTGACGAGGTTGTGC (SEC ID Nº:13)

[0087] Las composiciones descritas pueden usarse para tratar cualquier enfermedad en las que se produce proliferación celular no controlada tal como cáncer. Un listado no limitante de tipos diferentes de cánceres es el siguiente: linfomas (Hodgkins y no Hodgkins), leucemias, carcinomas, carcinomas de tejidos sólidos, carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas, sarcomas, gliomas, gliomas de alto grado, blastomas, neuroblastomas, plasmacitomas, histiocitomas, melanomas, adenomas, tumores hipoxicos, mielomas, linfomas o sarcomas relacionados con SIDA, cánceres metastásicos o cánceres en general.

[0088] Una lista representativa aunque no limitante de cánceres que las composiciones descritas puede usar para tratar es la siguiente: linfoma, linfoma de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, micosis fungoide, Enfermedad de Hodgkin, leucemia mieloide, cáncer de vejiga, cáncer cerebral, cáncer del sistema nervioso, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer renal, cánceres pulmonares, tal como cáncer microcítico pulmonar y cáncer no microcítico pulmonar, neuroblastoma/glioblastoma, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de próstata, cáncer de piel, cáncer hepático, melanoma, carcinomas de células escamosas de la boca, garganta, laringe y pulmón, cáncer de colon, cáncer de cuello uterino, carcinoma de cuello uterino, cáncer de mama y cáncer epitelial, cáncer renal, cáncer genitourinario, cáncer pulmonar, carcinoma esofágico, carcinoma de cabeza y cuello, cáncer de intestino grueso, cánceres hematopoyéticos; cáncer testicular; cánceres de colon y rectales, cáncer prostático o cáncer pancreático. Los compuestos descritos en la presente memoria también pueden usarse para el tratamiento de afecciones pre-cancerosas tales como displasias de cuello uterino y anales, otras displasias, displasias graves, hiperplasias, hiperplasias atípicas y neoplasias. Adicionalmente, numerosas enfermedades surgidas a raíz de inflamación crónica, por ejemplo, prostatitis e Hipertrofia Prostática Benigna (BPH),

así como diversos cánceres de la próstata, pueden verse afectados por los métodos y compuestos de la presente invención.

[0089] El locus del gen de DEFB1 (8p23.3) es un punto de acceso para delecciones y se ha relacionado con 5 pacientes con mal pronóstico. Por tanto, DEFB1 (y quizá PAX2) puede usarse como un biomarcador, por ejemplo, en una exploración para la detección precoz del cáncer de próstata. Adicionalmente, los datos presentados en la presente memoria indican que su pérdida puede producirse tan temprano como PIN (o incluso antes), y puede ser un factor de contribución principal para la aparición del cáncer de próstata.

10 B. Composiciones

1. Inmunoensayos

[0090] Existen numerosos métodos para la detección de analitos, tales como proteínas, tal como PAX2 y/o DEFB1, 15 conocidos o recientemente descubiertos en la técnica, que pueden usarse en los métodos descritos. Por ejemplo, PAX2 y/o DEFB1 pueden detectarse usando métodos convencionales de inmunodetección. Las etapas de diversos métodos de inmunodetección útiles se han descrito en la bibliografía científica, tal como, por ejemplo, Maggio *et al.*, Enzyme-Immunoassay, (1987) y Nakamura, *et al.*, Enzyme Immunoassays: Heterogeneous and Homogeneous Systems, Handbook of Experimental Immunology, Vol. 1: Immunochemistry, 27.1-27.20 (1986) cada una de las 20 cuales se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad y específicamente por sus enseñanzas con respecto a los métodos de inmunodetección. Los inmunoensayos, en su sentido más simple y directo, son ensayos de unión que implican la unión entre anticuerpos y antígenos. Se conocen muchos tipos y formatos de inmunoensayos y todos son adecuados para detectar los biomarcadores descritos. Ejemplos de inmunoensayos son los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), radioinmunoensayos (RIA), ensayos de precipitación 25 radioinmune (RIPA), ensayos de captura de inmunoperlas, transferencia de Western, transferencia puntual, ensayos de modificación en gel, Citometría de flujo, matrices de proteínas, matrices de perlas formando multicomplejos, captura magnética, formación de imágenes *in vivo*, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) y recuperación/localización de fluorescencia después de fotodecoloración (FRAP/FLAP).

[0091] En general, los inmunoensayos implican poner en contacto una muestra que se sospecha que contiene una molécula de interés (tal como los biomarcadores descritos) con un anticuerpo con la molécula de interés o poner en contacto un anticuerpo con una molécula de interés (tal como anticuerpos con los biomarcadores descritos) con una molécula que puede unirse por el anticuerpo, como puede ser el caso, en condiciones eficaces para permitir la formación de inmunocomplejos. La puesta en contacto de una muestra con el anticuerpo con una molécula de 30 interés o con la molécula que puede unirse mediante un anticuerpo con la molécula de interés en condiciones eficaces y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de inmunocomplejos (inmunocomplejos primarios) es generalmente una cuestión de poner en contacto simplemente la molécula o el anticuerpo y la muestra e incubar la mezcla durante un periodo de tiempo lo suficientemente largo para que los anticuerpos formen inmunocomplejos con, es decir, para unirse a, cualquier molécula (por ejemplo, antígenos) presentes a los cuales 35 pueden unirse los anticuerpos. En muchas formas de inmunoensayo, la composición muestra/anticuerpo tal como una sección de tejido, placa ELISA, transferencia puntual o transferencia de Western, puede lavarse después para eliminar cualquier especie de anticuerpo no específicamente unida, permitiendo únicamente que se detecten esos anticuerpos unidos específicamente con los inmunocomplejos primarios.

[0092] Los inmunoensayos pueden incluir métodos para detectar o cuantificar la cantidad de una molécula de interés (tal como los biomarcadores descritos o sus anticuerpos) en una muestra, cuyos métodos generalmente implican la detección o cuantificación de cualquier inmunocomplejo formado durante el proceso de unión. En general, la detección de la formación de inmunocomplejos se conoce bien en la técnica y puede conseguirse mediante la aplicación de numerosas estrategias. Estos métodos están generalmente basados en la detección de una etiqueta o 40 marcador, tal como cualquier etiqueta radiactiva, fluorescente, biológica o enzimática o cualquier otro marcador conocido. Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 y 4.366.241, cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad y específicamente por las enseñanzas con respecto a los métodos y marcadores de inmunodetección.

[0093] Como se usa en la presente memoria, un marcador puede incluir un colorante fluorescente, un miembro de un par de unión, tal como biotina/estreptavidina, un metal (por ejemplo, oro) o una etiqueta epítópica que puede interaccionar específicamente con una molécula que pueda detectarse, tal como produciendo una sustancia con color o fluorescente. Las sustancias adecuadas para marcar de forma detectable proteínas incluyen colorantes fluorescentes (conocidos también en la presente memoria como fluorocromos y fluoróforos) y enzimas que 45 reaccionan con sustratos colorimétricos (por ejemplo peroxidasa de rábano picante). El uso de colorantes fluorescentes se prefiere generalmente en la realización práctica de la invención ya que pueden detectarse a cantidades muy pequeñas. Adicionalmente, en el caso en el que antígenos múltiples reaccionen con una sola matriz, cada antígeno puede marcarse con un compuesto fluorescente distinto para la detección simultánea. Las manchas marcadas en la matriz se detectan usando un fluorímetro, indicando la presencia de una señal un antígeno unido a 60 un anticuerpo específico.

- [0094] Los fluoróforos son compuestos o moléculas que producen luminiscencia. Típicamente los fluoróforos absorben energía electromagnética a una longitud de onda y emiten energía electromagnética a una segunda longitud de onda. Los fluoróforos representativos incluyen, pero sin limitación, 1,5 IAEDANS; 1,8-ANS; 4-
- 5 Metilumbelifera; 5-carboxi-2,7-diclorofluoresceína; 5-Carboxifluoresceína (5-FAM); 5-Carboxinaftofluoresceína; 5-Carboxitetrametilrodamina (5-TAMRA); 5-Hidroxi Triptamina (5-HAT); 5-ROX (carboxi-X-rodamina); 6-Carboxirrodamina 6G; 6-CR 6G; 6-JOE; 7-Amino-4-metilcoumarina; 7-Aminoactinomicina D (7-AAD); 7-Hidroxi-4- I metilcoumarina; 9-Amino-6-cloro-2-metoxiacridina (ACMA); ABQ; Ácido Fucsínico; Naranja de Acridina; Rojo de Acridina; Amarillo de Acridina; Acriflavina; Acriflavina Feulgen SITSA; Aequorina (Fotoproteína); AFP - Proteína
- 10 AutoFluorescente - (Quantum Biotechnologies) véase sgGFP, sgBFP; Alexa Fluor 350T™; Alexa Fluor 430™; Alexa Fluor 488™; Alexa Fluor 532™; Alexa Fluor 546™; Alexa Fluor 568™; Alexa Fluor 594™; Alexa Fluor 633™; Alexa Fluor 647™; Alexa Fluor 660™; Alexa Fluor 680™; Alizarin Complexon; Rojo de Alizarina; Alococianina (APC); AMC, AMCA-S; Aminometilcoumarina (AMCA); AMCA-X; Aminoactinomicina D; Aminocoumarina; Azul de Anilina; Antrocil Estearato; APC-Cy7; APTRA-BTC; APTS; Rojo Brillante Astrazon 4G; Naranja Astrazon R; Rojo Astrazon
- 15 6B; GLL Amarillo Astrazon 7; Atabrina; ATTO- TAG™ CBQCA; ATTO-TAG™ FQ; Auramina; Aurofósfina G; Aurofósfina; BAO 9 (Bisaminofeniloxa-diazol); BCECF (a pH elevado); BCECF (a pH bajo); Berberin Sulfato; Beta Lactamasa; GFP cambiado a azul BFP (Y66H); Proteína Fluorescente Azul; BFP/GFP FRET; Bimane; Bisbenzemida; Bisbenzemida (Hoechst); bis- BTC; Blancofor FFG; Blancofor SV; BOBO™ -1; BOBO™ -3; Bodipy 492/515; Bodipy 493/503; Bodipy 500/510; Bodipy 505/515; Bodipy 530/550; Bodipy 542/563; Bodipy 558/568;
- 20 Bodipy 564/570; Bodipy 576/589; Bodipy 581/591; Bodipy 630/650-X; Bodipy 650/665-X; Bodipy 665/676; Bodipy F1; Bodipy FL ATP; Bodipy F1-Ceramida; Bodipy R6G SE; Bodipy TMR; conjugado de Bodipy TMR-X; Bodipy TMR-X, SE; Bodipy TR; Bodipy TR ATP; Bodipy TR-X SE; BO-PRO™ -1; BO-PRO™-3; Sulfoflavina Brillante FF; BTC; BTC-5N; Calceína; Azul de Calceína; Calcium Crimson -; Calcium Green; colorante Calcium Green-1 Ca²⁺; Calcium Green-2 Ca²⁺; Calcium Green-5N Ca²⁺; Calcium Green-C18 Ca²⁺; Calcium Orange; Calcofluor Blanco; Carboxi-X-
- 25 rodamina (5-ROX); Cascade Blue™; Cascade Yellow; Catecolamina; CCF2 (GeneBlazer); CFDA; CFP (Proteína Fluorescente Cian); CFP/YFP FRET; Clorofila; Cromomicina A; Cromomicina A; CL-NERF; CMFDA; Coelenterazina; Coelenterazina cp; Coelenterazina f; Coelenterazina fcp; Coelenterazina h; Coelenterazina hcp; Coelenterazina ip; Coelenterazina n; Coelenterazina O; Faloidina Coumarina; C-ficocianina; CPM I Metilcoumarina; CTC; CTC Formazán; Cy2™; Cy3.1 8; Cy3.5™;
- 30 Cy3™; Cy5.1 8; Cy5.5™; Cy5™; Cy7™; Cian GFP; Fluorosensor AMP cíclico (FiCRhR); Dabcil; Dansil; Dansil Amina; Dansil Cadaverina; Cloruro de Dansil; Dansil DHPE; fluoruro de Dansil; DAPI; Dapoxil; Dapoxil 2; Dapoxil 3'DCFDA; DCFH (Diacetato de Diclorodihidrofluoresceína); DDAO; DHR (Dihidrorrodamina 123); Di-4-ANEPPS; Di-8-ANEPPS (sin proporción); DiA (4-Di 16-ASP); Diacetato de Diclorodihidrofluoresceína (DCFH); DiD- Indicador Lipófilo; DiD (DiIC18(5)); DIDS; Dihidrorrodamina 123 (DHR); Dil (DiIC188(3)); I Dinitrofenol; DiO (DiOC18(3)); DiR;
- 35 DiR (DiIC188(7)); DM-NERF (a pH alto); DNP; Dopamina; DsRojo; DTAF; DY-630-NHS; DY-635-NHS; EBFP; ECFP; EGFP; ELF 97; Eosina; Eritrosina; Eritrosina ITC; Bromuro de Etidio; Homodímero-1 de Etidio (EthD-1); Eucriolina; EukoLight; cloruro de Europio (111); EYFP; Fast Blue; FDA; Feulgen (Pararosanilina); FIF (Fluorescencia Inducida por Formaldehído); FITC; Naranja Flazo; Fluo-3; Fluo-4; Fluoresceína (FITC); Diacetato de Fluoresceína; Fluoro-Emerald; Fluoro-Oro (Hidroxiestilbamidina); Fluor-Rubi; FluorX; FM 1-43™; FM 4-46; Fura Red™ (a pH alto); Fura
- 40 Red™/Fluo-3; Fura-2; Fura-2BCECF; Rojo Brillante de Genacril B; Amarillo Brillante de Genacril 10GF; Rosa de Genacril 3G; Amarillo de Genacril 5GF; GeneBlazer; (CCF2); GFP (S65T); GFP rojo desplazado (rsGFP); GFP de tipo silvestre sin excitación UV (wtGFP); GFP de tipo silvestre, excitación UV (wtGFP); GFPuv; Ácido Gloxálico; azul Granular; Hematoporfirina; Hoechst 33258; Hoechst 33342; Hoechst 34580; HPTS; Hidroxicoumarina; Hidroxiestilbamidina (FluoroGold); Hidroxitriptamina; Indo-1, elevado en calcio; Indo-1 bajo en calcio;
- 45 Indodicarbocianina (DiD); Indotricarbocianina (DiR); Inwhite Cf; JC-1; JO JO-1; JO-PRO-1; LaserPro; Laurodan; LDS 751 (ADN); LDS 751 (ARN); Leucofor PAF; LeucoforSF; LeucoforWS; Lisamina Rodamina; Lisamina Rodamina B; homodímero de Calceína/ Etidio; LOLO-1; LO-PRO-1; Amarillo Lucifer; Lysotracker Blue; Lysotracker Blue-White; Lysotracker Green; Lysotracker Red; Lysotracker Yellow; Lysosensor Blue; Lysosensor Green; Lysosensor Yellow/Blue; Mag Green; Magdalena Red (Phloxin B); Mag-Fura Red; Mag-Fura-2; Mag-Fura-5; Mag-Indo-
- 50 1; Verde Magnesio; Naranja Magnesio; Verde Malaquita; Azul Marina; I Maxilon Flavina Brillante 10 GFF; Maxilon Flavina Brillante 8 GFF; Merocianina; Metoxicoumarina; Mitotracker Verde FM; Mitotracker Naranja; Mitotracker Rojo; Mitramicina; Monobromobiman; Monobromobiman (mBB-GSH); Monochlorobiman; MPS (Estilbeno Pironina Verde Metilo); NBD; NBD Amina; Rojo Nilo; Nitrobenzoxedidol; Noradrenalina; Rojo Rápido Nuclear; Amarillo Nuclear i; Nylosan lavina Brillante E8G; Oregon Green™ 488; Oregon Green™ 500; Oregon Green™ 514;
- 55 Azul Pacífico; Pararosanilina (Feulgen); PBFI; PE-Cy5; PE-Cy7; PerCP; PerCP-Cy5.5; RojoTexas-PE (Rojo 613); Floxina B (Rojo Magdalena); Phorwite AR; Phorwite BKL; Phorwite Rev; Phorwite RPA; Fosfina 3R; PhotoResist; Ficoeritrina B [PE]; Ficoeritrina R [PE]; PKH26 (Sigma); PKH67; PMIA; Negro Azul Pontocromo; POPO-1; POPO-3; PO-PRO-1; PO-1 PRO-3; Primulina; Amarillo Proción; Yoduro de Propidio (P1); PyMPO; Pireno; Pironina; Pironina B; Flavina Brillante Pirozal 7GF; QSY 7; Mostaza de Quinacrina; Resorufina; RH 414; Rhod-2; Rodamina; Rodamina
- 60 110; Rodamina 123; Rodamina 5 GLD; Rodamina 6G; Rodamina B; Rodamina B 200; Rodamina B extra; Rodamina BB; Rodamina BG; Verde Rodamina; Falacidina Rodamina; Rodamina; Faloidina; Rojo de Rodamina; Rodamina WT; Rosa Bengalina; R-ficocianina; R-ficoeritrina (PE); rsGFP; S65A; S65C; S65L; S65T; Sapphira GFP; SBFI; Serotonin; Rojo Brillante Sevron 2B; Rojo Brillante Sevron 4G; Rojo Brillante Sevron I B; Naranja Sevron; Amarillo L Sevron; sgBFP™ (súper brillante BFP); sgGFP™ (super brillante GFP); SITS (Primulina; Ácido Estilbeno Isotiosulfónico);
- 65 SNAFL calceína; SNAFL-1; SNAFL-2; SNARF calceína; SNARF1; Verde Sodio; SpectrumAqua; SpectrumGreen;

SpectrumOrange; Spectrum Red; SPQ (6-metoxi- N-(3 sulfopropil) quinolinio); Estilbeno; Sulforrodamina B y C; Sulforrodamina Extra; SYTO 11; SYTO 12; SYTO 13; SYTO 14; SYTO 15; SYTO 16; SYTO 17; SYTO 18; SYTO 20; SYTO 21; SYTO 22; SYTO 23; SYTO 24; SYTO 25; SYTO 40; SYTO 41; SYTO 42; SYTO 43; SYTO 44; SYTO 45; SYTO 59; SYTO 60; SYTO 61; SYTO 62; SYTO 63; SYTO 64; SYTO 80; SYTO 81; SYTO 82; SYTO 83; SYTO 84; 5 SYTO 85; SYTOX Blue; SYTOX Green; SYTOX Orange; Tetraciclina; Tetrametilrodamina (TRITC); Texas Red™; conjugado de Texas Red-X™; Tiadicarbocianina (DiSC3); Rojo R de Tiazina; Naranja Tiazol; Tioflavina 5; Tioflavina S; Tioflavina TON; Thiolyte; Naranja de Tiazol; Tinopol CBS (Calcofluor Blanco); TIER; TO-PRO-1; TO-PRO-3; TO-PRO-5; TOTO-1; TOTO-3; Tricolor (PE-Cy5); Tetrametil Rodaminos TioCianato TRITC; True Blue; Tru Red; Ultralite; Uranina B; Uvitex SFC; wt GFP; WW781; X-Rodamina; XRITC; Naranja Xileno; Y66F; Y66H; Y66W; 10 Amarillo GFP; YFP; YO-PRO-1; YO- PRO 3; YOYO-1 ;YOYO-3; Verde Sybr; naranja Tiazol (colorantes intercalantes); nanopartículas semiconductoras tales como manchas cuánticas o fluoróforos confinados (que pueden activarse con luz u otra fuente energética electromagnética) o una combinación de los mismos.

[0095] El marcado puede ser directo o indirecto. En el marcado directo, el anticuerpo de detección (el anticuerpo para la molécula de interés) o la molécula de detección (la molécula que puede unirse por un anticuerpo a la molécula de interés) incluye un marcador. La detección del marcador indica la presencia del anticuerpo de detección o molécula de detección, que a su vez indica la presencia de la molécula de interés o de un anticuerpo con la molécula de interés, respectivamente. En el marcapieza indirecto, una molécula o resto adicional se pone en contacto con, o se genera en el sitio de, el inmunocomplejo. Por ejemplo, una molécula o resto generador de una señal tal como una enzima puede unirse a o asociarse con el anticuerpo de detección o molécula de detección. La molécula generadora de señales puede después generar una señal detectable en el sitio del inmunocomplejo. Por ejemplo, cuando se proporciona una enzima con sustrato adecuado, puede producir un producto visible o detectable en el sitio del inmunocomplejo. El ensayo ELISA usa este tipo de marcapieza indirecto.

[0096] Como otro ejemplo de marcapieza indirecto, una molécula adicional (que puede denominarse agente de unión) puede unirse a la molécula de interés o al anticuerpo (anticuerpo primario) con la molécula de interés, tal como un anticuerpo secundario con el anticuerpo primario, puede ponerse en contacto con el inmunocomplejo. La molécula adicional puede tener un marcador o una molécula o resto generador de señales. La molécula adicional puede ser un anticuerpo, que puede por tanto denominarse anticuerpo secundario. La unión de un anticuerpo secundario al anticuerpo primario puede formar un denominado sándwich con el primer anticuerpo (o primario) y la molécula de interés. Los inmunocomplejos pueden ponerse en contacto con el anticuerpo secundario, marcado, en condiciones eficaces y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de inmunocomplejos secundarios. Los inmunocomplejos secundarios pueden después lavarse generalmente para retirar cualquier anticuerpo secundario marcado no específicamente unido y el marcador restante en los inmunocomplejos secundarios puede después detectarse. La molécula adicional puede estar o incluir uno de un par de moléculas o restos que pueden unirse entre sí, tal como el par biotina/avidina. En este modo, el anticuerpo de detección o la molécula de detección debe incluir el otro miembro del par.

[0097] Otros métodos de marcapieza indirecto incluyen la detección de inmunocomplejos primarios mediante una estrategia en dos etapas. Por ejemplo, una molécula (que puede denominarse como primer agente de unión), tal como un antibiótico, que tiene una afinidad de unión para la molécula de interés o anticuerpo correspondiente puede usarse para formar inmunocomplejos secundarios, como se ha descrito anteriormente. Después del lavado, los inmunocomplejos secundarios pueden ponerse en contacto con otra molécula (que puede denominarse segundo agente de unión) que tiene una afinidad de unión para el primer agente de unión, de nuevo en condiciones eficaces y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de inmunocomplejos (formando así inmunocomplejos terciarios). El segundo agente de unión puede unirse a un marcador detectable o a una molécula o resto generador de señales, permitiendo la detección de inmunocomplejos terciarios así formados. Este sistema puede proporcionar amplificación de señales.

[0098] Los inmunoensayos que implican la detección de sustancias, tales como una proteína o un anticuerpo con una proteína específica, incluyen ensayos sin marcador, métodos de separación de proteínas (es decir, electroforesis), ensayos de captura en soporte sólido o detección *in vivo*. Los ensayos sin marcador son generalmente medios de diagnóstico para determinar la presencia o ausencia de una proteína específica, o un anticuerpo con una proteína específica, en una muestra. Los métodos de separación de proteínas son adicionalmente útiles para evaluar las propiedades físicas de la proteína, tales como el tamaño o la carga neta. Los ensayos de captura son generalmente más útiles para evaluar cuantitativamente la concentración de una proteína específica, o anticuerpo con una proteína específica, en una muestra. Finalmente, la detección *in vivo* es útil para evaluar los patrones de expresión espacial de la sustancia, es decir, en los que la sustancia puede encontrarse en un sujeto, tejido o células.

[0099] A menos que las concentraciones sean suficientes, los complejos moleculares ($[Ab-Ag]_n$) generados por la interacción de antígeno/anticuerpo son visibles a simple vista, pero también pueden detectarse cantidades más pequeñas y medirse debido a su capacidad para dispersar un haz de luz. La formación de complejos indica que los dos reactivos están presentes, y en los ensayos de immunoprecipitación se usa una concentración constante de un anticuerpo reactivo para medir el antígeno específico ($[Ab-Ag]_n$) y los antígenos reactivos se usan para detectar el

anticuerpo específico ($[Ab-Ag]n$). Si las especies reactivas se usan para recubrir previamente células (como en ensayos de hemaglutinación) o partículas muy pequeñas (como en ensayo de aglutinación con látex), la "aglutinación" de las partículas recubiertas es visible a concentraciones mucho más bajas. Una diversidad de ensayos basados en estos principios elementales es de uso común, incluyendo ensayo de inmunodifusión de Ouchterlony, inmunolectroforesis en cohete y ensayos inmunturbidométricos y nefelométricos. Las principales limitaciones de tales ensayos son la sensibilidad limitada (límites de detección inferiores) en comparación con ensayos que emplean marcadores y, en algunos casos, debido a que concentraciones muy altas de analito pueden realmente inhibir la formación de complejos, necesitando protectores que hagan los procedimientos más complejos. Algunos de estos ensayos de Grupo 1 proceden de la fecha del descubrimiento de anticuerpos y ninguno de ellos tiene un "marcador" real (por ejemplo, Agenz). Otros tipos de inmunoensayos que son sin marcador dependen de inmunosensores, y una diversidad de instrumentos que pueden detectar directamente interacciones anticuerpo-antígeno se encuentran actualmente disponibles en el mercado. La mayoría dependen de la generación de una onda evanescente en una superficie con sensor con un ligando inmovilizado, que permite controlar de manera continua la unión al ligando. Los inmunosensores permiten una fácil investigación de interacciones cinéticas y, con la llegada de instrumentos especializados de bajo costo, pueden en el futuro encontrar una amplia aplicación en inmunoanálisis.

[0100] El uso de inmunoensayos para detectar una proteína específica puede implicar la separación de las proteínas por electroforesis. La electroforesis es la migración de moléculas cargadas en solución en respuesta a un campo eléctrico. Su velocidad de migración depende de la fuerza del campo, de la carga neta, tamaño y forma de las moléculas y también de la fuerza iónica, viscosidad y temperatura del medio en las que se mueven las moléculas. Como una herramienta analítica, la electroforesis es sencilla, rápida y muy sensible. Se usa analíticamente para estudiar las propiedades de especies cargadas sencillas y como una técnica de separación.

[0101] Generalmente la muestra se hace correr en una matriz soporte tal como papel, acetato de celulosa, gel de almidón, agarosa o gel de poliacrilamida. La matriz inhibe el mezclado convectivo causado por calentamiento y proporciona un registro de procesado electroforético: al final del procesamiento, la matriz puede teñirse y usarse para escanear, autoradiografiar o almacenar. Además, las matrices soporte más comúnmente usadas - agarosa y poliacrilamida - proporcionan un medio de separación de moléculas por tamaño, ya que son geles porosos. Un gel poroso puede actuar como un filtro retardando, o en algunos casos obstruyendo completamente, el movimiento de grandes macromoléculas permitiendo al mismo tiempo que moléculas más pequeñas migren libremente. Dado a que los geles de agarosa diluidos son generalmente más rígidos y fáciles de manipular que la poliacrilamida de la misma concentración, se usa agarosa para separar macromoléculas más grandes tales como ácidos nucleicos, proteínas grandes y complejos de proteína. La poliacrilamida, que es fácil de manipular y preparar a altas concentraciones, se usa para separar la mayoría de las proteínas y pequeños oligonucleótidos que requieren un tamaño de poro de gel pequeño para el retraso.

[0102] Las proteínas son compuestos anfotéricos, su carga neta por lo tanto se determina por el pH del medio en el que están suspendidas. En una solución con un pH por encima de su punto isoeléctrico, una proteína tiene una carga neta negativa y migra hacia el ánodo en un campo eléctrico. Debajo de su punto eléctrico, la proteína está positivamente cargada y migra hacia el cátodo. La carga neta que lleva una proteína es además independiente de su tamaño - es decir, la carga que lleva por unidad de masa (o longitud, dado que proteínas y ácidos nucleicos son macromoléculas lineales) de molécula difiere de proteína a proteína. Por lo tanto a un pH determinado, y en condiciones no desnaturalizantes, la separación electroforética de las proteínas se determina tanto por tamaño como por carga de las moléculas.

[0103] El dodecil sulfato sódico (SDS) es un detergente aniónico que desnaturaliza las proteínas "atrapándolas alrededor" de la estructura polipeptídica - y el SDS se une a proteínas claramente específicamente en una proporción de masa de 1,4:1. Al hacer esto, el SDS confiere una carga negativa al polipéptido en proporción con respecto a su longitud. Adicionalmente, normalmente es necesario reducir los puentes disulfuro en las proteínas (desnaturalizar) antes de que adopten la configuración enrollada al azar necesaria para la separación por tamaño; esto se realiza con 2-mercptoetanol o ditioreitol (DTT). En la desnaturalización por lo tanto las separaciones con SDS-PAGE la migración se determina no por carga eléctrica intrínseca del polipéptido, sino por el peso molecular.

[0104] La determinación del peso molecular se realiza por SDS-PAGE de proteínas de peso molecular conocido junto con la proteína a caracterizar. Existe una relación lineal entre el logaritmo del peso molecular de un polipéptido desnaturalizado con SDS, o ácidos nucleicos naturales, y su R_f . El R_f se calcula como la proporción de la distancia migrada a la molécula que migró por un marcador colorante-frontal. Una forma simple de determinar el peso molecular relativo por electroforesis (M_r) es representar gráficamente una curva patrón de la distancia migrada frente al $\log_{10} PM$ para muestras conocidas y leer el $\log M_r$ de las muestras después de medir la distancia migrada sobre el mismo gel.

[0105] En electroforesis bidimensional, las proteínas se fraccionan en primer lugar en base a una propiedad física y, en una segunda etapa, en base a otra. Por ejemplo, el isoelectrofoque puede usarse para la primera dimensión, convenientemente realizada en un gel de tubo y electroforesis con SDS en un gel de tabla puede usarse para la segunda dimensión. Un ejemplo de un procedimiento es el de O'Farrell, P.H., High Resolution Two-dimensional

Electrophoresis of Proteins, J. Biol. Chem. 250: 4007-4021 (1975), incorporado en la presente memoria por referencia en su totalidad por sus enseñanzas sobre los métodos de electroforesis bidimensionales. Otros ejemplos incluyen pero sin limitación, los encontrados en Anderson, L y Anderson, NG, High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins, Proc. Natl. Acad. Sci. 74:5421-5425 (1977), Ornstein, L., Disc 5 electrophoresis, L. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121:321349 (1964), cada uno de los cuales se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad por las enseñanzas con respecto a los métodos de electroforesis.

[0106] Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 227:680 (1970), que se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad por las enseñanzas con 10 respecto a los métodos de electroforesis, describe un sistema discontinuo para resolver proteínas desnaturalizadas con SDS. El ion conductor en el sistema de tampón Laemmli es cloruro y el ion rastreador es glicina. Por consiguiente, el gel de resolución y el gel de apilamiento se realizan en tampones Tris-HCl (de diferente concentración y pH), mientras que el tampón tanque es Tris-glicina. Todos los tampones contienen SDS a 0,1 %.

15 [0107] Un ejemplo de un inmunoensayo que usa electroforesis que se contempla en los métodos actuales es el análisis de transferencia de Western. La transferencia o inmunotransferencia de Western permite la determinación de la masa molecular de una proteína y la medición de cantidades relativas de la proteína presentes en muestras diferentes. Los métodos de detección incluyen la detección quimioluminiscente y cromatogénica. Pueden encontrarse métodos convencionales para análisis de transferencia de Western por ejemplo en D.M. Bollag *et al.*, 20 Protein Methods (2^a edición 1996) y E. Harlow & D. Lane, Antibodies, a Laboratory Manual (1988), Patente de Estados Unidos 4.452.901, cada uno de los cuales se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad por las enseñanzas con respecto a los métodos de transferencia de Western. Generalmente, las proteínas se separan por electroforesis en gel, normalmente SDS-PAGE. Las proteínas se transfieren a una lámina de un papel de transferencia especial, por ejemplo, nitrocelulosa, aunque pueden usarse otros tipos de papel o 25 membranas. Las proteínas conservan el mismo patrón de separación que conservan en el gel. La transferencia se incuba con una proteína genética (tal como proteínas lácteas) para unirse a cualquier resto adhesivo que esté en la nitrocelulosa. Después se añade un anticuerpo a la solución que es capaz de unirse a su proteína específica.

[0108] El acoplamiento de anticuerpos específicos a antígenos específicos inmovilizados puede visualizarse 30 fácilmente por técnicas de inmunoensayo enzimático indirectas, normalmente usando un sustrato cromogénico (por ejemplo fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante) o sustratos quimioluminiscentes. Otras posibilidades para explorar incluyen el uso de marcadores fluorescentes o radioisótopos (por ejemplo, fluoresceína, ¹²⁵I). La sondas para la detección de anticuerpos pueden ser anti-inmunoglobulinas conjugadas, proteína A estafilocócica conjugada (que se une a IgG), o sondas con anticuerpos primarios biotinilados (por ejemplo, avidina/estreptavidina 35 conjugadas).

[0109] El poder de la técnica se basa en la detección simultánea de una proteína específica mediante su antigenicidad y su masa molecular. Las proteínas se separan primero por masa en SDS-PAGE, y después se detectan específicamente en la etapa de inmunoensayo. Por tanto, los patrones de proteína (escalas) pueden 40 procesarse simultáneamente para aproximar la masa molecular de la proteína de interés en una muestra heterogénea.

[0110] El ensayo de desplazamiento de gel o ensayo de desplazamiento de movilidad electroforética (EMSA) puede usarse para detectar las interacciones entre las proteínas de unión a ADN y sus secuencias de reconocimiento a 45 ADN afines, tanto de manera cualitativa como cuantitativa. Se describen técnicas ejemplares en Ornstein L., Disc electrophoresis - I: Background and theory, Ann. NY Acad. Sci. 121:321 -349 (1964), y Matsudiara, PT and DR Burgess, SDS microslab linear gradient polyacrylamide gel electrophoresis, Anal. Biochem. 87:386-396 (1987), cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad por las enseñanzas con respecto a los ensayos de desplazamiento en gel.

50 [0111] En un ensayo de desplazamiento en gel general, las proteínas purificadas o extractos celulares en bruto pueden incubarse con una sonda de ADN o ARN marcada (por ejemplo, ³²P-radiomarcada), seguido por separación de los complejos de la sonda libre a través de un gel de poliacrilamida no desnaturalizante. El complejo migra más lentamente a través del gel que la sonda no unida. Dependiendo de la actividad de la proteína de unión, una sonda 55 marcada puede ser monocatenaria o bicatenaria. Para la detección de proteínas de unión a ADN tales como factores de transcripción, pueden usarse proteínas purificadas o parcialmente purificadas, o extractos celulares nucleares. Para la detección de proteínas de unión a ARN, pueden usarse proteínas purificadas o parcialmente purificadas, o extractos celulares citoplásmicos o nucleares. La especificidad de la proteína de unión a ADN o ARN para el supuesto sitio de unión se establece por experimentos de competencia usando fragmentos de ADN o ARN u 60 oligonucleótidos que contienen un sitio de unión para la proteína de interés u otra secuencia no relacionada. Las diferencias en cuanto a la naturaleza e intensidad del complejo formado en presencia de un competidor específico y no específico permite la identificación de interacciones específicas. Se hace referencia a Promega, Ensayo de Desplazamiento en Gel FAQ, disponible en <<http://www.promega.com/faq/gelshfaq.html>> (visitada por última vez el 25 de marzo del 2005), que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad por las enseñanzas 65 con respecto a los métodos de desplazamiento de gel.

[0112] Los métodos de desplazamiento en gel pueden incluir el uso, por ejemplo, de formas coloidales de tinción con azul de COOMASSIE (Imperial Chemicals Industries, Ltd) para detectar proteínas en geles tales como geles de electroforesis en poliacrilamida. Tales métodos se describen, por ejemplo, en Neuhoff *et al.*, Electrophoresis 6:427-448 (1985) y Neuhoff *et al.*, Electrophoresis 9:255-262 (1988), cada uno de los cuales se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad por las enseñanzas con respecto a los métodos de desplazamiento en gel. Además de los métodos de ensayo de proteína convencional indicados anteriormente, se describe una composición de limpieza de combinación y tinción de proteína en la Patente de Estados Unidos N° 5.424.000 incorporada en la presente memoria por referencia en su totalidad por sus enseñanzas con respecto a métodos de desplazamiento en gel. Las soluciones pueden incluir ácidos fosfórico, sulfúrico y nítrico y colorante Ácido Violeta.

[0113] El Ensayo de Radioinmuno Precipitación (RIPA) es un ensayo sensible que usa antígenos radiomarcados para detectar anticuerpos específicos en suero. Los antígenos se dejan reaccionar con el suero y después precipitan usando un reactivo especial, tal como, por ejemplo, perlas de sepharose proteína A. El inmunoprecipitado radiomarcado unido se analiza después normalmente por electroforesis en gel. El ensayo de Radioinmunoprecipitación (RIPA) se usa frecuentemente como un ensayo confirmador para el diagnóstico de la presencia de anticuerpos contra el VIH. RIPA también se denomina en la técnica Ensayo Farr, Ensayo con Precipitina, Radioinmuno Ensayo con Precipitina; Análisis de Radioinmunoprecipitación; Análisis de Radioinmunoprecipitación; y Análisis de Radioinmunoprecipitación.

[0114] Aunque los inmunoensayos anteriores que utilizan electroforesis para separar y detectar las proteínas específicas de interés permiten la evaluación del tamaño de proteína, no son muy sensibles para evaluar la concentración de proteína. Sin embargo, también se contemplan inmunoensayos en los que la proteína o anticuerpo específico para la proteína se une a un soporte sólido (por ejemplo, tubo, pocillo, perla o célula) para capturar el anticuerpo o proteína de interés, respectivamente, de una muestra, combinado con un método para detectar la proteína o anticuerpo específico para la proteína sobre el soporte. Ejemplos de tales inmunoensayos incluyen Radioinmunoensayo (RIA), Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (ELISA), Citometría de flujo, matriz de proteínas, ensayo de perla formando multicomplejos y captura magnética.

[0115] El Radioinmunoensayo (RIA) es un ensayo cuantitativo clásico para detección de reacciones antígeno-anticuerpo usando una sustancia radiactivamente marcada (radioligando), tanto directa como indirectamente, para medir la unión de la sustancia no marcada con un anticuerpo específico u otro sistema receptor. El radioinmunoensayo se usa, por ejemplo, para someter a ensayo niveles de hormonas en sangre sin necesidad de usar un inmunoensayo. También pueden medirse sustancias no inmunogénicas (por ejemplo, haptenos) si están acoplados a proteínas transportadoras más grandes (por ejemplo, gammaglobulina bovina o albúmina de suero humana) capaces de inducir la formación de anticuerpos. RIA implica mezclar un antígeno radiactivo (debido a la facilidad con la que los átomos de yodo pueden introducirse en los restos tirosina en una proteína, a menudo se usan los isótopos radiactivos ^{125}I o ^{131}I) con anticuerpo a ese antígeno. El anticuerpo se une generalmente a un soporte sólido, tal como un tubo o perlas. El antígeno no marcado o "frío" se añade después en cantidades conocidas y se mide la cantidad de antígeno marcado desplazado. Inicialmente el antígeno radiactivo se une a los anticuerpos. Cuando se añade el antígeno frío, los dos compiten por los sitios de unión al anticuerpo - y a mayores concentraciones de antígeno frío, más uniones al anticuerpo, desplazando la variante radiactiva. Los anticuerpos unidos se separan de los no unidos en solución y la radiactividad de cada uno se usa para representar gráficamente una curva de unión. La técnica es extremadamente sensible y específica.

[0116] El Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA), o más genéricamente denominado EIA (InmunoEnsayo Enzimático), es un inmunoensayo que puede detectar un anticuerpo específico para una proteína. En tal ensayo, un marcador detectable unido a un reactivo de unión a anticuerpo o de unión a antígeno es una enzima. Cuando se expone a su sustrato, la enzima reacciona de tal manera para producir un resto químico que puede detectarse, por ejemplo, por espectrofotometría, fluorometría o medios visuales. Las enzimas que pueden usarse para marcar de forma detectable reactivos útiles para detección incluyen, pero sin limitación, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa, β -galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, asparaginasa, alcohol deshidrogenasa de levadura, alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfatasa isomerasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa.

Para descripciones de procedimientos ELISA, véase Voller, A. *et al.*, J. Clin. Pathol. 31:507-520 (1978); Butler, J. E., Meth. Enzymol. 73:482-523 (1981); Maggio, E. (ed.), Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, 1980; Butler, J. E., In: Structure of Antigens, Vol. 1 (Van Regenmortel, M., CRC Press, Boca Raton, 1992, pp. 209-259; Butler, J. E., In: van Oss, C. J. *et al.*, (eds), Immunochemistry, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1994, pp. 759-803; Butler, J. E. (ed.), Immunochemistry of Solid-Phase Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, 1991); Crowther, "ELISA: Theory and Practice," In: Methods in Molecule Biology, Vol. 42, Humana Press; Nueva Jersey, 1995; Patente de Estados Unidos 4.376.110, cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad y específicamente por las enseñanzas con respecto a los métodos ELISA.

[0117] Los expertos en la materia conocen variaciones de técnicas ELISA. En una variación, los anticuerpos que pueden unirse a proteínas pueden inmovilizarse sobre una superficie seleccionada que presenta afinidad a

proteínas, tal como un pocillo en una placa de microtitulación de poliestireno. Después, a los pocillos puede añadirse una composición de ensayo que se sospecha que contiene un antígeno marcador. Después de la unión y lavado para eliminar los inmunocomplejos no específicamente unidos, el antígeno unido puede detectarse. La detección puede conseguirse mediante la adición de un segundo anticuerpo específico para la proteína diana, que está unido a 5 un marcador detectable. Este tipo de ELISA es un simple "ELISA sandwich". La detección también puede conseguirse por la adición de un anticuerpo secundario, seguido por la adición de un anticuerpo terciario que tiene afinidad de unión por el anticuerpo secundario, estando el tercer anticuerpo unido a un marcador detectable.

[0118] Otra variación es un ELISA de competencia. En el ensayo de ELISA de competencia, las muestras de ensayo 10 compiten por la unión con cantidades conocidas de antígenos o anticuerpos marcados. La cantidad de especies reactivas en la muestra puede determinarse mezclando la muestra con la especie marcada conocida antes o durante la incubación con pocillos recubiertos. La presencia de especies reactivas en la muestra actúa para reducir la cantidad de especies marcadas disponibles para unión con el pocillo y por tanto reduce la última señal.

[0119] Independientemente del formato empleado, los ELISA tienen diversas características en común, tal como recubrimiento, incubación o unión, lavado para eliminar las especies no unidas específicamente y detección de los inmunocomplejos unidos. Los antígenos o anticuerpos pueden unirse a un soporte sólido, tal como en forma de placa, perlas, barras, membranas o matrices de columna y la muestra a analizar se aplica al antígeno o anticuerpo inmovilizado. En un recubrimiento una placa con antígeno o anticuerpo, uno generalmente incuba los pocillos de la 20 placa con una solución del antígeno o anticuerpo, bien toda la noche o durante un periodo especificado de horas. Los pocillos de la placa pueden después lavarse para eliminar el material incompletamente adsorbido. Cualquier superficie disponible restante de los pocillos puede "recubrirse" con una proteína no específica que es antigenicamente neutra con respecto al antisuero de ensayo. Estos incluyen albúmina de suero bovina (BSA), caseína y soluciones de leche en polvo. El recubrimiento permite bloquear los sitios de adsorción no específicos 25 sobre la superficie de inmovilización y por tanto reduce el fondo producido por la unión no específica del antisuero sobre la superficie.

[0120] En los ELISA, también puede usarse un medio de detección secundario o terciario en lugar de un procedimiento directo. Por tanto, después de la unión de una proteína o anticuerpo con el pocillo, el recubrimiento 30 con un material no reactivo para reducir el fondo y lavado para eliminar el material no unido, la superficie de inmovilización se pone en contacto con la muestra clínica o biológica de control para someterse a ensayo en condiciones eficaces para permitir la formación de inmunocomplejos (antígeno/anticuerpo). La detección del inmunocomplejo requiere después un agente de unión secundario marcado o un agente de unión secundario junto con un tercer agente de unión marcado.

[0121] La expresión "en condiciones eficaces para permitir la formación de inmunocomplejos (antígeno/anticuerpo)" significa que las condiciones incluyen diluir los antígenos y anticuerpos con soluciones tales como BSA, gammaglobulina bovina (BGG) y solución salina tamponada con fosfato (PBS)/Tween para reducir la unión no específica y para promover una proporción razonable de señal con respecto a ruido.

[0122] Las condiciones adecuadas también significa que la incubación es a una temperatura y durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la unión eficaz. Las etapas de incubación pueden típicamente estar en forma de aproximadamente 1 minuto a doce horas, a temperaturas de aproximadamente 20 ° a 30 °C, o pueden incubarse durante una noche a aproximadamente de 0 °C a aproximadamente 10 °C.

[0123] Siguiendo todas las etapas de incubación en un ELISA, la superficie en contacto puede lavarse para eliminar el material que no está formando complejos. Un procedimiento de lavado puede incluir lavar con una solución tal como PBS/Tween o tampón borato. Después de la formación de inmunocomplejos específicos entre la muestra de ensayo y el material originalmente unido, y posterior lavado, puede determinarse la aparición de cantidades de 50 inmunocomplejos incluso muy pequeñas.

[0124] Para proporcionar un medio de detección, el anticuerpo secundario o terciario pueden tener un marcador asociado para permitir la detección, como se ha descrito anteriormente. Esto puede ser una enzima que puede generar desarrollo de color después de incubar con un sustrato cromogénico apropiado. Por tanto, por ejemplo, 55 puede ponerse en contacto e incubar el primero o segundo inmunocomplejos con un anticuerpo marcado durante un periodo de tiempo y en condiciones que favorezcan el desarrollo de la formación de inmunocomplejos posterior (por ejemplo, incubación durante 2 horas a temperatura ambiente en una solución que contiene PBS tal como PBS-Tween).

[0125] Después de la incubación con el anticuerpo marcado y posterior lavado para eliminar el material no unido, puede cuantificarse la cantidad de marcador, por ejemplo, incubando con un sustrato cromogénico tal como urea y púrpura de bromocresol o ácido 2,2'-azido-di-(3-etil-benziazolin-6-sulfónico [ABTS] y H₂O₂, en el caso de peroxidasa como etiqueta enzimática. La cuantificación puede conseguirse después midiendo el grado de generación de color, por ejemplo, usando un espectrofotómetro de espectro visible.

- [0126]** La matriz de proteína son sistemas de ensayo de unión a ligando en fase sólida que usa proteínas inmovilizadas en superficies que incluyen vidrio, membranas, pocillos de microtitulación, placas de espectrómetro de masas y perlas u otras partículas. Los ensayos son altamente paralelos (que forman complejos) y frecuentemente miniaturizados (micromatrices, microplacas de proteína). Sus ventajas incluyen ser rápidos y automatizables, 5 capaces de elevada sensibilidad, economicidad de reactivos y proporcionar abundantes datos en un simple experimento. El soporte bioinformático es importante; la manipulación de datos requiere un programa informático sofisticado y análisis de comparación de datos. Sin embargo, el programa informático puede adaptarse del que se usa para micromatrices de ADN, así como gran parte del soporte físico y sistemas de detección.
- 10 **[0127]** Uno de los formatos principales es la matriz de captura, en la que los reactivos de unión a ligando, que son normalmente anticuerpos pero también pueden ser armazones de proteínas alternativas, péptidos o aptámeros de ácidos nucleicos, se usan para detectar moléculas diana en mezclas tales como extractos de plasma o tisulares. En diagnóstico, las matrices de captura pueden usarse para realizar múltiples inmunoensayos en paralelo, sometiendo a ensayo varios analitos en sueros individuales, por ejemplo y sometiendo a ensayo muchas muestras de suero 15 simultáneamente. En proteómica, se usan matrices de captura para cuantificar y comparar los niveles de proteínas en diferentes muestras en personas sanas y enfermas, es decir perfilado de expresión de proteínas. En el formato de matriz se usan proteínas distintas de aglutinantes a ligando específicos para las exploraciones de interacción funcional *in vitro* tales como proteína-proteína, proteína-ADN, proteína-fármaco, receptor-ligando, enzima-sustrato, etc. Los reactivos de captura en sí mismos se seleccionan y exploran contra muchas proteínas, que también pueden 20 realizarse en un formato de matriz contra dianas de proteína múltiples.
- [0128]** Para la construcción de matrices, las fuentes de proteínas incluyen sistemas de expresión basados en células para proteínas recombinantes, purificación a partir de fuentes naturales, producción *in vitro* por sistemas de traducción acelulares y métodos sintéticos para péptidos. Muchos de estos métodos pueden automatizarse para 25 producción de alto rendimiento. Para las matrices de captura y análisis de función de proteínas, es importante que las proteínas deban estar correctamente plegadas y funcionales; lo que no siempre sucede, por ejemplo, en los que las proteínas recombinantes se extraen de bacterias en condiciones desnaturalizantes. Sin embargo, matrices de proteínas desnaturalizadas son útiles en la exploración de anticuerpos para reactividad cruzada, identificación de autoanticuerpos y selección de proteínas de unión a ligando.
- 30 **[0129]** Las matrices de proteína se han diseñado como una miniaturización de métodos de inmunoensayo conocidos tales como ELISA y transferencia puntual, que a menudo utilizan lectura fluorescente y se facilitan por sistemas de detección robóticos y de alto rendimiento para permitir realizar ensayos múltiples en paralelo. Los soportes físicos normalmente usados incluyen portaobjetos de vidrio, silicio, micropocillos, nitrocelulosa o membranas de PVDF y 35 microperlas magnéticas y otras. Aunque el microgoteo de proteína suministrada sobre superficies planas es el formato más común, arquitecturas alternativas incluyen dispositivos de centrifugación CD basados en desarrollos en diseños de microfluidización (Gyros, Monmouth Junction, NJ) y microplacas especializadas, tal como microcanales modificados por ingeniería genética en una placa (por ejemplo, The Living Chip™, Biotrove, Woburn, MA) y diminutas marcas 3D sobre una superficie de silicio (Zyomyx, Hayward CA). También pueden usarse partículas en 40 suspensión como la base de micromatrices, siempre que estén codificadas para identificación; los sistemas incluyen codificación de color para microperlas (Luminex, Austin, TX; Bio-Rad Laboratories) y nanocrystales semiconductores (por ejemplo, QDots™, Quantum Dot, Hayward, CA) y códigos de barras para perlas (UltraPlex™, SmartBead Technologies Ltd, Babraham, Cambridge, Reino Unido) y microvarillas multimetálicas (por ejemplo, partículas Nanobarcodes™, Nanoplex Technologies, Mountain View, CA). Las perlas también pueden ensamblarse en 45 micromatrices planas sobre microplacas semiconductoras (tecnología LEAPS, BioArray Solutions, Warren, NJ).
- [0130]** La inmovilización de proteínas implica que tanto el reactivo de acoplamiento como la naturaleza de la superficie estén acoplados. Una superficie soporte de micromatriz de proteína buena es estable químicamente antes y después de los procedimientos de acoplamiento, que permite una buena morfología de mancha, presenta una 50 unión no específica mínima, no contribuye al fondo en los sistemas de detección y es compatible con diferentes sistemas de detección. El método de inmovilización usado es reproducible, aplicable a proteínas de diferentes propiedades (tamaño, hidrofilicidad, hidrofobicidad), tratable para alto rendimiento y automatización y compatible con la conservación de la actividad de proteína completamente funcional. La orientación de la proteína unida a la superficie se reconoce como un factor importante presentando este al ligando o sustrato en estado activo; para las 55 micromatrices de captura los resultados de unión más eficaces se obtienen con los reactivos de captura orientados, lo que generalmente requiere un marcado de proteína específico de sitio.
- [0131]** Los métodos covalentes y no covalentes de inmovilización de proteínas se usan y tienen diversos pros y contras. La adsorción pasiva a superficies es metodológicamente sencilla, pero permite un escaso control 60 cuantitativo u orientativo. Esto puede o no alterar las propiedades funcionales de la proteína, y la reproducibilidad y eficacia son variables. Los métodos de acoplamiento covalentes proporcionan un ligamiento estable, que puede aplicarse a una diversidad de proteínas y posee buena reproducibilidad; sin embargo, la orientación puede ser variable, derivatización química que puede modificar la función de la proteína y requiere una superficie interactiva estable. Los métodos de captura biológicos que utilizan una etiqueta sobre la proteína proporcionan una unión 65 estable y la unión de la proteína específicamente y en orientación reproducible, pero los reactivos biológicos deben

estar en primer lugar adecuadamente inmovilizados y la micromatriz puede requerir la manipulación especial y tener una estabilidad variable.

[0132] Para la fabricación de micromatrizes de proteínas se han descrito diversas químicas y etiquetas de inmovilización. Los sustratos para la unión covalente incluyen portaobjetos de vidrio recubiertos con reactivos de silano que contienen amino o aldehído. En el sistema the Versalink™ (Prolinx, Bothell, WA) se consigue el acoplamiento covalente reversible por interacción entre la proteína derivatizada con ácido fenildiborónico y ácido salicilhidroxámico inmovilizado sobre la superficie de soporte. Esto también tiene una unión de fondo bajo y una fluorescencia intrínseca baja y permite que las proteínas inmovilizadas conserven la función. La unión no covalente de proteína no modificada se produce dentro de las estructuras porosas tal como HydroGel™ (PerkinElmer, Wellesley, MA), basado en un gel de poliacrilamida tridimensional. Este sustrato se describe que proporciona un fondo particularmente bajo sobre micromatrizes de vidrio con una alta capacidad y conservación de la función de proteína. Los métodos de acoplamiento biológico ampliamente usados son mediante interacciones de biotina/estreptavidina o hexahistidina/Ni, habiendo modificado aproximadamente la proteína. La biotina puede conjugarse con una estructura de polilisina inmovilizada en una superficie tal como dióxido de titanio (Zyomyx) o pentóxido de tántalo (Zeptosens, Witterswil, Suiza).

[0133] Los métodos de fabricación de micromatrizes incluyen imprenta robótica de contacto, eyección de tinta, aplicación puntual piezoelectrónica y fotolitografía. Diversos impresores robotizados de micromatrizes comerciales se encuentran disponibles [por ejemplo Packard Biosciences] así como equipo manual [V & P Scientific]. Las colonias bacterianas pueden colocarse robóticamente en rejillas sobre membranas de PVDF para la inducción de la expresión de proteínas *in situ*.

[0134] En el límite de tamaño y densidad de mancha se encuentran las nanomicromatrizes, con manchas a escala espacial nanométrica, que permiten realizar miles de reacciones en una sola microplaca de menos de 1 mm cuadrado. BioForce Laboratories ha desarrollado nanomatrices con 1521 manchas de proteína en 85 micrómetros cuadrados, equivalente a 25 millones de manchas por cm cuadrado, en el límite para la detección óptica; sus métodos de lectura son fluorescencia y microscopía de fuerza atómica (AFM).

[0135] Los métodos de detección y marcado con fluorescencia se usan ampliamente. La misma instrumentación que se usa para la lectura de micromatrizes de ADN es aplicable para las micromatrizes de proteína. Para la presentación diferencial, micromatrizes de captura (por ejemplo anticuerpos) pueden explorarse con proteínas fluorescentemente marcadas de dos estados celulares diferentes, en los que los lisados celulares se conjugan directamente con diferentes fluoróforos (por ejemplo Cy-3, Cy-5) y se mezclan, de tal manera que el color actúa como una lectura para cambios en la abundancia de la diana. La sensibilidad de lectura fluorescente puede amplificarse de 10-100 veces por amplificación de señal con tiramida (TSA) (PerkinEhner Lifesciences). La tecnología de guía de onda plana (Zeptosens) permite la detección de fluorescencia ultrasensible, con la ventaja adicional de que hay procedimientos de lavado intermedios. También puede conseguirse alta sensibilidad con perlas y partículas en suspensión, usando como marcador ficoeritrina (Luminex) o las propiedades de nanocróstales semiconductores (Quantum Dot). Se han desarrollado diversas lecturas nuevas alternativas, especialmente en el área de biotecnología comercial. Estas incluyen adaptación de resonancia de plasmón superficial (HTS Biosystems, Intrinsic Bioprobes, Tempe, AZ), amplificación de ADN de enrollamiento circular (Molecular Staging, New Haven CT), espectrometría de masas (Intrinsic Bioprobes; Ciphergen, Fremont, CA), dispersión de luz por resonancia (Genicon Sciences, San Diego, CA) y microscopía de fuerza atómica [BioForce Laboratories].

[0136] Las micromatrizes de captura forman la base de microplacas y micromatrizes de diagnóstico para el perfilado de expresión. Estas emplean reactivos de captura de alta afinidad, tales como anticuerpos convencionales, dominios sencillos, armazones modificados por ingeniería genética, péptidos o aptámeros de ácidos nucleicos para unir y detectar ligandos diana específicos de una manera a alto rendimiento.

[0137] Las micromatrizes de anticuerpos tienen las propiedades necesarias de especificidad y fondo aceptable, y algunos se encuentran disponibles en el mercado (BD Biosciences, San Jose, CA; Clontech, Mountain View, CA; BioRad; Sigma, St. Louis, MO). Los anticuerpos para las micromatrizes de captura se preparan por inmunización convencional (suero polyclonal e hibridomas), o como fragmentos recombinantes, normalmente expresados en *E. coli*, después de la selección de bibliotecas de presentación de fagos o ribosomas (Cambridge Antibody Technology, Cambridge, UK; Biolnvent, Lund, Suecia; Affitech, Walnut Creek, CA; Biosite, San Diego, CA). Además de los anticuerpos convencionales, en las micromatrizes también pueden usarse fragmentos Fab y scFv, dominios V sencillos de camélidos o equivalentes humanos modificados por ingeniería genética (Domantis, Waltham, MA).

[0138] El término "armazón" se refiere a dominios de proteínas de unión a ligando, que están modificados por ingeniería genética en variantes múltiples capaces de unir diversas moléculas diana con propiedades de especificidad y afinidad similares a anticuerpos. Las variantes pueden producirse en un formato de genoteca y seleccionarse contra dianas individuales por presentación de fagos, bacteriana o de ribosomas. Dichos armazones o estructuras marco incluyen "Affibodies" basados en proteína A de *Staph. aureus* (Affibody, Bromma, Suecia), "Trinectinas" basadas en fibronectinas (Phylos, Lexington, MA) y "Anticalinas" basadas en la estructura de lipocaína

(Pieris Proteolab, Freising-Weihenstephan, Alemania). Estas pueden usarse en micromatrices de captura de una manera similar a anticuerpos y pueden tener ventajas de firmeza y facilidad de producción.

[0139] Las moléculas de captura no proteicas, en particular los aptámeros de ácido nucleico monocatenarios que se unen a ligandos proteicos con alta especificidad y afinidad, también se usan en micromatrices (SomaLogic, Boulder, CO). Los aptámeros se seleccionan a partir de bibliotecas de oligonucleótidos mediante procedimiento Selex™ y su interacción con proteínas puede potenciarse por unión covalente mediante la incorporación de desoxiuridina bromada y entrecruzamiento activado por UV (fotoaptámeros). El fotoentrecrezamiento de ligandos reduce la reactividad en cruzado de los aptámeros debido a los requerimientos estéricos específicos. Los aptámeros tienen las ventajas de una fácil producción por síntesis de oligonucleótidos automatizada y la estabilidad y firmeza del ADN; en micromatrices de fotoaptámeros, pueden usarse tinciones de proteína fluorescente universal para detectar la unión.

[0140] Los analitos de proteína que se unen a micromatrices de anticuerpo pueden detectarse directamente o mediante un anticuerpo secundario en un ensayo de tipo sándwich. El marcate directo se usa para comparación de diferentes muestras con diferentes colores. Cuando pares de anticuerpos dirigidos al mismo ligando proteico está disponible, los inmunoensayos de tipo sándwich proporcionan una alta especificidad y sensibilidad y son por lo tanto el método de selección para proteínas de baja abundancia tales como citocinas; también ofrecen la posibilidad de detección de modificaciones de proteína. Los métodos de detección sin marcadores, incluyendo espectrometría de masas, resonancia de plasmón superficial y microscopía de fuerza atómica, impiden la modificación del ligando. Lo que se requiere de cualquier método es una sensibilidad y especificidad óptima, con un fondo bajo para proporcionar una alta señal con respecto al ruido. Dado que las concentraciones de analito incluyen un amplio intervalo, la sensibilidad debe ajustarse apropiadamente; la dilución en serie de la muestra o uso de anticuerpos o afinidades diferentes son soluciones a este problema. Las proteínas de interés son frecuentemente aquellas en baja concentración en los líquidos corporales y extractos, que requieren la detección del intervalo pg o inferior tales como citosinas o la baja expresión de productos en células.

[0141] Una alternativa a una micromatriz de moléculas de captura es una realizada a través de tecnología de "impresión molecular" en la que los péptidos (por ejemplo, desde las regiones C-terminal de las proteínas) se usan como moldes para generar cavidades estructuralmente complementarias específicas de secuencia en una matriz polimerizable; después las cavidades pueden capturar específicamente proteínas (desnaturalizadas) que tienen la secuencia de aminoácidos primaria apropiada (ProteinPrint™, Aspira Biosystems, Burlingame, CA).

[0142] Otra metodología que puede usarse desde el punto de vista diagnóstico y en el perfilado de expresión es la micromatriz ProteinChip® (Ciphergen, Fremont, CA), en cuyas superficies cromatográficas en fase sólida se unen a proteínas con características similares de carga o hidrofobicidad a partir de mezclas tales como plasma o extractos tumorales, y la espectrometría de masas SELDI-TOF se usa para la detección de las proteínas retenidas.

[0143] Las microplacas funcionales a gran escala se han construido inmovilizando grandes cantidades de proteínas purificadas y se han usado para ensayar una amplia diversidad de funciones bioquímicas, tales como interacciones de proteínas con otras proteínas, interacciones de fármaco-diana, enzima-sustratos, etc. Generalmente estas requieren una biblioteca de expresión, clonada en *E. coli*, levadura o similar a partir de la cual las proteínas expresadas se purifican después, por ejemplo mediante un marcador His y se inmovilizan. La transcripción/traducción de proteínas acelulares es una alternativa viable para la síntesis de proteínas que no se expresan bien en sistemas bacterianos u otros sistemas *in vivo*.

[0144] Para la detección de interacciones proteína-proteína, las matrices de proteína pueden ser alternativas *in vitro* con respecto a los sistemas de dos híbridos de levaduras basados en células y puede ser útil cuando esta última es deficiente, de tal manera que las interacciones que implican proteínas secretadas o proteínas con puentes disulfuro. Análisis a alto rendimiento de actividades bioquímicas en micromatrices se han descrito para proteínas quinasas de levadura y para diversas funciones (interacciones proteína-proteína y proteína-lípido) del proteoma de levadura, en el que una gran proporción de todas las fases de lectura abierta de levadura se expresó y se inmovilizó en una micromatriz. Las "microplacas de proteoma" a gran escala prometen ser muy útiles en la identificación de interacciones funcionales, exploración de fármacos, etc. (Proteometrix, Branford, CT).

[0145] Al igual que una presentación bidimensional de elementos individuales, una micromatriz de proteína puede usarse para explorar bibliotecas de presentación de fagos o de ribosomas, para seleccionar compañeros de unión específicos que incluyen anticuerpos, armazones sintéticos, péptidos y heptámeros. De esta manera, puede realizarse exploración de "biblioteca contra biblioteca". La exploración de candidatos farmacológicos en bibliotecas químicas combinatorias contra una micromatriz de dianas de proteína identificadas a partir del genoma se proyecta en otra aplicación de la estrategia.

[0146] Un ensayo de perlas que forma multicomplejos, tales como por ejemplo, la Micromatriz de Perlas Citométricas BD™, es una serie de partículas espectralmente separadas que puede usarse para capturar y cuantificar analitos solubles. El analito después se mide mediante detección de una emisión basada en fluorescencia y análisis de citometría de flujo. El ensayo de perlas formando multicomplejos genera datos que son comparables

con los ensayos basados en ELISA, pero de una manera "formando multicomplejos" o simultánea. La concentración de desconocidos se calcula para la micromatriz de perlas citométricas al igual que con cualquier ensayo con formato sándwich, es decir, usando patrones conocidos y representando gráficamente desconocidos contra una curva patrón. Adicionalmente, el ensayo de perlas formando multicomplejos permite la cuantificación de analitos solubles 5 en muestras nunca anteriormente considerada debido a limitaciones del volumen de la muestra. Además de los datos cuantitativos, imágenes visuales poderosas pueden generarse que revelan perfiles únicos o firmas que proporcionan al usuario información adicional de un vistazo.

2. Anticuerpos

10

[0147] En la presente memoria se describen anticuerpos que se unen específicamente a PAX2 o DEFB1 que pueden usarse para detectar PAX2 o DEFB1 en una muestra en los métodos de diagnóstico descritos en la presente memoria o pueden usarse para inhibir la interacción entre PAX2 y DEFB1 en los métodos descritos en la presente memoria de tratamiento o prevención del cáncer de próstata o PIN.

15

[0148] El término "anticuerpos" se usa en la presente memoria en un sentido amplio e incluye anticuerpos policlonales y monoclonales. Además de moléculas de inmunoglobulina intactas, también se incluye en el término "anticuerpos" fragmentos o polímeros de estas moléculas de inmunoglobulina y versiones humanas o humanizadas de moléculas de inmunoglobulina o sus fragmentos, siempre que estas se seleccionen por su capacidad para 20 interaccionar, por ejemplo, con PAX2 o DEFB1, de tal manera que PAX2 se inhibe a partir de la interacción con DEFB 1. También se describen anticuerpos que se unen a las regiones descritas de PAX2 o DEFB1 implicadas en la interacción entre PAX2 y DEFB1. Los anticuerpos pueden someterse a ensayo para detectar su actividad deseada usando los ensayos *in vitro* descritos en la presente memoria, o por métodos análogos, después de lo cual se 25 someten a ensayo sus actividades terapéuticas y/o profilácticas *in vivo* de acuerdo con métodos de ensayo clínicos conocidos.

[0149] La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos es decir los anticuerpos individuales dentro de la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes 30 en un pequeño subconjunto de las moléculas de anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales de la presente memoria incluyen específicamente anticuerpos "químéricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que el resto de la cadena (o cadenas) es idéntico a u homólogo a las secuencias correspondientes en los anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a 35 otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad antagonista deseada (véase, la Patente de Estados Unidos N°: 4.816.567 y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)).

[0150] Los anticuerpos monoclonales descritos pueden prepararse usando cualquier procedimiento que produzca 40 anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales descritos pueden prepararse usando métodos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, Nature, 256:495 (1975). En un método de hibridoma, un ratón u otro animal hospedador apropiado se inmunitiza típicamente con un agente inmunizante para generar linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*, por ejemplo, usando los complejos VIH 45 Env-CD4-co-receptor descritos en la presente memoria.

[0151] Los anticuerpos monoclonales también pueden prepararse por métodos de ADN recombinante, tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos N°: 4.816.567 (Cabilly *et al.*). El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales descritos puede aislar fácilmente y secuenciarse usando procedimientos convencionales (por 50 ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las bibliotecas de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos activos también pueden generarse y explorarse usando técnicas de presentación de fagos, por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N°: 5.804.440 de Burton *et al.* y en la Patente de Estados Unidos N°: 6.096.441 de Barbas *et al.*

55

[0152] Los métodos *in vitro* también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir sus fragmentos, particularmente, fragmentos Fab, puede conseguirse usando técnicas rutinarias conocidas en la técnica, por ejemplo, puede usarse papaína para realizar la digestión. Se describen ejemplos de digestión con papaína en el documento WO 94/29348 publicado el 22 de diciembre de 1994 y en la 60 Patente de Estados Unidos N°: 4.342.566. La digestión con papaína de anticuerpos típicamente produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos Fab, cada uno con un solo sitio de unión a antígeno y un fragmento Fc residual. El tratamiento con pepsina produce un fragmento que tiene dos sitios de combinación antigenómicos y que aun es capaz de entrecruzar el antígeno.

[0153] Los fragmentos, tanto unidos a otras secuencias o no, también pueden incluir inserciones, delecciones, sustituciones u otras modificaciones seleccionadas de regiones particulares o restos de aminoácidos específicos, siempre que la actividad del anticuerpo o fragmentos de anticuerpos no esté significativamente modificada o alterada en comparación con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo no modificado. Estas modificaciones pueden proporcionar algunas propiedades adicionales, tales como para eliminar/añadir aminoácidos capaces de formar puentes disulfuro, para aumentar su bio-longevidad, modificar sus características secretoras, etc. En cualquier caso, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo debe poseer una propiedad bioactiva, tal como unión específica a su antígeno afín. Regiones funcionales o activas del anticuerpo o fragmento de anticuerpo pueden identificarse por mutagénesis de una región específica de la proteína, seguido por la expresión y ensayo del polipéptido expreso.

5 Tales métodos son fácilmente aparentes para un experto en la materia y puede incluir mutagénesis específica de sitio del ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo (Zoller, M.J. Curr. Opin. Biotechnol. 3:348-354, 1992).

[0154] Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" o "anticuerpos" también se refiere a un anticuerpo humano y/o anticuerpo humanizado. Muchos anticuerpos no humanos (por ejemplo, los derivados de ratones, ratas o conejos) son naturalmente antigenicos en seres humanos y por tanto pueden dar lugar a respuestas inmunes no deseables cuando se administran a seres humanos. Por lo tanto, el uso de anticuerpos humanos o humanizados en los métodos sirve para disminuir la probabilidad de que un anticuerpo administrado a un ser humano suscite una respuesta inmunitaria no deseable.

20 [0155] Los anticuerpos humanos descritos pueden prepararse usando cualquier técnica. Los ejemplos de técnicas para la producción de anticuerpos monoclonales humanos incluyen los descritos por Cole *et al.* (*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77, 1985) y por Boerner *et al.* (*J. Immunol.*, 147(1):86-95, 1991). También pueden producirse anticuerpos humanos (y fragmentos de los mismos) usando bibliotecas de presentación de fagos (Hoogenboom *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 227:381, 1991; Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581, 1991).

[0156] Los anticuerpos humanos descritos también pueden obtenerse a partir de animales transgénicos. Por ejemplo, ratones transgénicos, mutantes que son capaces de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos, en respuesta a inmunización, se han descrito (véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551-255 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362: 255-258 (1993); Brugermann *et al.*, *Year in Immunol.*, 7:33 (1993)). Específicamente, la delección homocigota del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (J(H)) en estos ratones mutantes químéricos y de línea germinal da como resultado la inhibición completa de producción de anticuerpos endógenos y el éxito de la transferencia de la micromatriz de gen del anticuerpo de la línea germline humana tal como ratones mutantes de la línea germline en la producción de anticuerpos humanos 35 después de exposición al antígeno. Los anticuerpos que tienen la actividad deseada se seleccionan usando complejos Env-CD4-co-receptor como se describe en la presente memoria.

[0157] Las técnicas de humanización de anticuerpos generalmente implican el uso de tecnología de ADN recombinante para manipular la secuencia de ADN que codifica a una o más cadenas polipeptídicas de una molécula de anticuerpo. Por consiguiente, una forma humanizada de un anticuerpo no humano (o un fragmento del mismo) es un anticuerpo químérico o una cadena de anticuerpo (o un fragmento del mismo, tal como una parte Fv, Fab, Fab' u otra parte de unión a antígeno de un anticuerpo) que contiene una parte de un sitio de unión a antígeno de un anticuerpo no humano (donante) integrado en el armazón de un anticuerpo humano (receptor).

45 [0158] Para generar un anticuerpo humanizado, restos de una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una molécula de anticuerpo receptora (humana) se sustituye por restos de una o más CDR de una molécula de anticuerpo donante (no humana) que se sabe que tiene las características de unión a antígeno deseadas (por ejemplo, un determinado nivel de especificidad y afinidad por el antígeno diana). En algunos casos, los restos marco conservados (FR) Fv del anticuerpo humano se sustituyen por restos no humanos 50 correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden contener restos que no se encuentran tampoco en el anticuerpo receptor ni en las CDR importadas o secuencias de región marco conservadas. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente que es no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la CDR y posiblemente algunos restos FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de 55 roedores. Los anticuerpos humanizados generalmente contienen al menos una parte de una región constante de anticuerpo (Fc), típicamente la de un anticuerpo humano (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986), Reichmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-327 (1988), y Presta, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)).

[0159] En la técnica se conocen bien métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, pueden 60 generarse anticuerpos humanizados de acuerdo con los métodos de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986), Riech-mann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988), Verhoeven *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las CDR o secuencias CDR de roedores por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Los métodos que pueden usarse para producir anticuerpos humanizados también se describen en la Patente de Estados Unidos N°: 4.816.567 (Cabilly *et al.*), Patente de Estados Unidos N°: 5.565.332 (Hoogenboom *et al.*), Patente de Estados Unidos N°: 5.721.367 (Kay *et al.*), Patente de Estados Unidos N°: 5.837.243 (Deo *et al.*),

Patente de Estados Unidos Nº: 5.939.598 (Kucherlapati *et al.*), Patente de Estados Unidos Nº: 6.130.364 (Jakobovits *et al.*) y Patente de Estados Unidos Nº: 6.180.377 (Morgan *et al.*).

[0160] La administración de los anticuerpos puede realizarse como se describe en la presente memoria. También existen estrategias de ácidos nucleicos para la administración de anticuerpos. Los anticuerpos anti PAX2 o DEFB1 ampliamente neutralizantes y fragmentos de anticuerpos también pueden administrarse a pacientes o sujetos como una preparación de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) que codifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo, de tal manera que las células propias del paciente o sujeto captan el ácido nucleico y producen y secretan el anticuerpo o fragmento de anticuerpo codificado. La administración del ácido nucleico puede realizarse mediante cualquier método, como se describe en la presente memoria, por ejemplo.

3. Similitudes de secuencia

[0161] Se entiende que como se describe en la presente memoria el uso de los términos homología e identidad significa la misma cosa que similitud. Por tanto, por ejemplo, si el uso de la palabra homología se usa entre dos secuencias no naturales debe entenderse que esta no es necesariamente indicativa de una relación evolutiva entre estas dos secuencias, sino también teniendo en cuenta la similitud o relación entre sus secuencias de ácido nucleico. Muchos de los métodos para determinar la homología entre dos moléculas evolutivamente relacionadas se aplican rutinariamente a cualquiera de dos o más ácidos nucleicos o proteínas con el fin de medir la similitud de secuencia independientemente de si estas están evolutivamente relacionadas o no.

[0162] En general, se entiende que una manera de definir cualquier variante y derivado conocido o aquellos que puedan surgir de los genes descritos y proteínas en la presente memoria, es mediante la definición de las variantes y derivados en cuanto a homología con respecto a secuencias conocidas específicas. Esta identidad de secuencias particulares descrita en la presente memoria también se analiza en cualquier parte dentro del mismo. En general, variantes de genes y proteínas de la presente memoria descritas típicamente tienen al menos aproximadamente un porcentaje de homología de 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 con respecto a la secuencia indicada o la secuencia natural. Los expertos en la materia entienden fácilmente cómo determinar la homología de las proteínas o ácidos nucleicos, tales como genes. Por ejemplo, la homología puede calcularse después de alinear las dos secuencias de manera que la homología esté al nivel más elevado.

[0163] Otra manera de calcular la homología puede realizarse por algoritmos publicados. El alineamiento óptimo de secuencias para comparación puede realizarse mediante algoritmo de homología local de Smith y Waterman *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981), el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, *J. MoL Biol.* 48: 443 (1970), mediante la búsqueda de métodos similares de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444(1988), por implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Paquete Informático Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por inspección.

[0164] Los mismos tipos de homología pueden obtenerse para ácidos nucleicos mediante por ejemplo los algoritmos descritos en Zuker, *M. Science* 244:48-52,1989, Jaeger *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7706-7710, 1989, Jaeger *et al.* *Methods Enzymol.* 183:281-306, 1989 que se incorporan en la presente memoria por referencia para al menos material relacionado con alineamiento de ácido nucleico. Se entiende que cualquiera de los métodos típicamente puede usarse y que en algunos casos los resultados de estos diversos métodos pueden diferir, aunque el experto en la materia entiende que si se encuentra identidad con al menos uno de estos métodos, se dirá que las secuencias tienen la identidad indicada y escrita en la presente memoria.

[0165] Por ejemplo, como se usa en la presente memoria, una secuencia indicada que tiene un porcentaje de homología particular con otra secuencia se refiere a secuencias que tienen la homología indicada calculada mediante uno o más de los métodos de cálculo descritos anteriormente. Por ejemplo, una primera secuencia tiene una homología de 80 por ciento, como se define en la presente memoria, con respecto a una segunda secuencia si la primera secuencia se calcula que tiene 80 por ciento de homología con la segunda secuencia usando el método de cálculo de Zuker incluso si la primera secuencia no tiene una homología de 80 por ciento con respecto a la segunda secuencia como se calcula mediante cualquiera de otro de los métodos de cálculo. Como otro ejemplo, una primera secuencia tiene 80 por ciento de homología, como se define en la presente memoria, con una segunda secuencia si la primera secuencia se calcula que tiene 80 por ciento de homología con la segunda secuencia usando tanto el método de cálculo de Zuker como el método de cálculo de Pearson y Lipman incluso si la primera secuencia no tiene 80 por ciento de homología con la segunda secuencia como se calcula mediante el método de cálculo de Smith y Waterman, el método de Needleman y Wunsch, los métodos de cálculo de Jaeger o cualquiera de los otros métodos de cálculo. En otro ejemplo más, una primera secuencia tiene 80 por ciento de homología, como se define en la presente memoria, con respecto a una segunda secuencia si la primera secuencia se calcula que tiene un 80 por ciento de homología con respecto a la segunda secuencia usando cada uno de los métodos de cálculo (aunque, en la realización práctica, los métodos de cálculo diferentes a menudo darán como resultado diferentes porcentajes de homología calculados).

4. Hibridación/hibridación selectiva

[0166] El término hibridación típicamente significa una secuencia que conduce la interacción entre al menos dos moléculas de ácido nucleico, tal como un cebador o una sonda y un gen. La interacción conducida por secuencia significa una interacción que se produce entre dos nucleótidos o análogos de nucleótidos o derivados de nucleótidos de una manera específica de nucleótidos. Por ejemplo, la interacción de G con C o la interacción de A con T son interacciones conducidas por secuencias. Las interacciones conducidas por secuencias típicamente se producen en la cara de Watson-Crick o en la cara Hoogsteen del nucleótido. La hibridación de dos ácidos nucleicos está influenciada por diversas condiciones y parámetros conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, la concentración salina, pH y temperatura de la reacción influirán a si las dos moléculas de ácido nucleico hibridarán.

[0167] Los parámetros para la hibridación selectiva entre dos moléculas de ácido nucleico se conocen bien por los expertos en la materia. Por ejemplo, en algunas realizaciones las condiciones de hibridación selectivas pueden definirse como condiciones de hibridación rigurosas. Por ejemplo, la rigurosidad de la hibridación se controla mediante temperatura y concentración salina o una o ambas de las etapas de hibridación y de lavado. Por ejemplo, las condiciones de hibridación para conseguir la hibridación selectiva puede implicar hibridación en solución de alta fuerza iónica (6X SSC o 6X SSPE) a una temperatura que es de aproximadamente 12-25 °C por debajo de la Tm (la temperatura de fusión a la cual la mitad de las moléculas se disocian de sus compañeras de hibridación) seguido por lavado a una combinación de temperatura y concentración salina seleccionadas de manera que la temperatura de lavado sea aproximadamente de 5 °C a 20 °C por debajo de la Tm. La temperatura y condiciones salinas se determinan fácilmente empíricamente en experimentos preliminares en los que las muestras de ADN de referencia inmovilizadas en filtros se hibridan con un ácido nucleico de interés marcado y después se lava en condiciones de diferentes rigurosidades. Las temperaturas de hibridación son típicamente mayores para las hibridaciones de ADN-ARN y ARN-ARN. Las condiciones pueden usarse como se describe anteriormente para conseguir la rigurosidad, o como se conoce en la técnica (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989; Kunkel *et al.* Methods Enzymol. 1987;154:367,1987 que se incorpora en la presente memoria por referencia para material al menos relacionado con hibridación de ácidos nucleicos). Una condición de hibridación rigurosa preferible para hibridación de ADN:ADN puede ser aproximadamente 68 °C (en solución acuosa) en 6X SSC o 6X SSPE seguido por lavado a 68 °C. La rigurosidad de hibridación y lavado, si se desea, puede reducirse por consiguiente a medida que el grado de complementariedad deseada disminuye, y además, dependiendo de la riqueza de G-C o A-T de cualquier área en el que se busca variabilidad. Del mismo modo la rigurosidad de hibridación y lavado, si se desea, puede disminuirse por consiguiente a medida que aumenta la homología deseada y adicionalmente, dependiendo de la riqueza G-C o A-T de cualquier área en la cual se desea alta homología como se conoce en la técnica.

[0168] Otro modo de definir la hibridación selectiva es buscando la cantidad (porcentaje) de uno de los ácidos nucleicos unido al otro ácido nucleico. Por ejemplo, en algunas realizaciones las condiciones de hibridación selectivas deberían ser cuando al menos aproximadamente 60, 65, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 por cien del ácido nucleico limitante está unido al ácido nucleico no limitante. Típicamente, el cebador no limitante está por ejemplo en un exceso de 10 o 100 o 1000 veces. Este tipo de ensayo puede realizarse bajo condiciones en las que tanto el cebador limitante como el no limitante están por ejemplo, 10 veces o 100 veces o 1000 veces por debajo de su k_d o en el que solamente una de las moléculas de ácido nucleico es 10 veces o 100 veces o 1000 o en la que una o ambas moléculas de ácido nucleico está por encima de su k_d .

[0169] Otro modo de definir la hibridación selectiva es buscando el porcentaje del cebador que consigue manipularse enzimáticamente en condiciones en las que se requiere la hibridación para promover la manipulación enzimática deseada. Por ejemplo, en algunas realizaciones las condiciones de hibridación selectivas deberían ser cuando al menos aproximadamente, 60, 65, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 por cien del cebador está manipulado enzimáticamente en condiciones que promueven la manipulación enzimática, por ejemplo si la manipulación enzimática es extensión de ADN, entonces las condiciones de hibridación selectivas deberían ser cuando al menos aproximadamente 60, 65, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 por cien de las moléculas cebadoras están extendidas. Las condiciones preferidas también incluyen aquellas sugeridas por el fabricante o indicadas en la técnica como que son apropiadas para la realizar la manipulación enzimática.

[0170] Del mismo modo, al igual que con la homología, debe entenderse que existe una diversidad de métodos descritos en la presente memoria para determinar el nivel de hibridación entre dos moléculas de ácido nucleico. Se entiende que estos métodos y condiciones pueden proporcionar diferentes porcentajes de hibridación entre dos moléculas de ácido nucleico, pero a menos que se indique de otra manera, cumplir los parámetros de cualquiera de los métodos debe ser suficiente. Por ejemplo, si se requiere hibridación de 80% y siempre que se produzca hibridación con los parámetros requeridos en cualquiera de estos métodos, se considera descrito en la presente memoria.

[0171] Debe entenderse que los expertos en la materia entienden que si una composición o método cumple con cualquiera de estos criterios para la hibridación determinante tanto colectiva o en solitario, es una composición o método que se describe en la presente memoria.

5 5. Ácidos nucleicos

[0172] Existe una diversidad de moléculas descritas en la presente memoria que están basadas en ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos descritos están constituidos por ejemplo por nucleótidos, análogos de nucleótidos o sustitutos de nucleótidos. Los ejemplos no limitantes de estas y otras moléculas se describen en la presente memoria. Se entiende que por ejemplo, cuando se expresa un vector en una célula, que el ARNm expresado típicamente estará formado por A, C, G y U. Del mismo modo, se entiende que si, por ejemplo, se introduce una molécula antisentido en una célula o en un entorno celular mediante por ejemplo administración exógena, es ventajoso que la molécula antisentido esté constituida de nucleótidos análogos que reduzcan la degradación de la molécula antisentido en el entorno celular.

15

I. Nucleótidos y moléculas relacionadas

[0173] Un nucleótido es una molécula que contiene un resto básico, un resto azúcar y un resto fosfato. Los nucleótidos pueden unirse entre sí a través de sus restos fosfato y restos azúcar creando un ligamiento internucleósido. El resto base de un nucleótido puede ser adenin-9-il (A), citosin-1-il (C), guanin-9-il (G), uracil-1-il (U) y timin-1-il (T). El resto de azúcar de un nucleótido es una ribosa a una desoxirribosa. El resto fosfato de un nucleótido es fosfato pentavalente. Un ejemplo no limitante de un nucleótido sería un 3'-AMP (3'-adenosin monofosfato) o 5'-GMP (5'-guanosina monofosfato). Existen muchas variedades de estos tipos de moléculas disponibles en la técnica y disponibles en la presente memoria.

25

[0174] Un análogo de nucleótido es un nucleótido que contiene algún tipo de modificación en cualquiera de los restos base, azúcar o fosfato. Las modificaciones de nucleótidos se conocen bien en la técnica e incluirían por ejemplo, 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina y 2-aminoadenina así como modificaciones en los restos azúcar o fosfato. Existen muchas variedades de estos tipos de moléculas disponibles en la técnica y disponibles en la presente memoria.

30

[0175] Los sustitutos de nucleótidos son moléculas que tienen propiedades funcionales similares a las de los nucleótidos, pero no contienen un resto fosfato, tal como un ácido nucleico peptídico (PNA). Los sustitutos de nucleótidos son moléculas que reconocerán ácidos nucleicos de una manera Watson-Crick o Hoogsteen, pero que están unidos entre sí a través de un resto distinto de un resto fosfato. Los sustitutos de nucleótidos son capaces de conformarse en una estructura de tipo doble hélice cuando interaccionan con el ácido nucleico diana apropiado. Existen muchas variedades de estos tipos de moléculas disponibles en la técnica y disponibles en la presente memoria.

[0176] También existe posibilidad de unir otros tipos de moléculas (conjugados) a nucleótidos o análogos de nucleótidos para potenciar, por ejemplo, la captación celular. Los conjugados pueden unirse químicamente al nucleótido o análogos de nucleótidos. Tales conjugados incluyen pero sin limitación restos lipídicos tales como un resto de colesterol (Letsinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556). Existen muchas variedades de estos tipos de moléculas disponibles en la técnica disponibles en la presente memoria.

45

[0177] Una interacción de Watson-Crick es al menos una interacción con la cara Watson-Crick de un nucleótido, análogo de nucleótido o sustituto de nucleótido. La cara Watson-Crick de un nucleótido, análogo de nucleótido o sustituto de nucleótido incluye las posiciones C2, N1 y C6 de un nucleótido basado en purina, análogo de nucleótido o sustitución de nucleótido y las posiciones C2, N3, C4 de un nucleótido, análogo de nucleótido, o sustituto de nucleótido basado en pirimidina.

50

[0178] Una interacción de Hoogsteen es la interacción que tiene lugar en la cara Hoogsteen de un nucleótido o análogo de nucleótido, que se expone al surco mayor del dúplex de ADN. La cara Hoogsteen incluye la posición N7 y grupos reactivos (NH₂ u O) en la posición C6 de nucleótidos purina.

55

II. Secuencias

[0179] Existe una variedad de secuencias relacionadas con las moléculas de proteína implicadas en las rutas de señalización descritas en la presente memoria, por ejemplo PAX2, o cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria para preparar PAX2, todos los cuales se codifican por ácidos nucleicos o son ácidos nucleicos. Las secuencias para los análogos humanos de estos genes, así como otros análogos y alelos de estos genes y variantes de corte y empalme y otros tipos de variantes, se encuentran disponibles en una diversidad de bases de datos de proteínas y genes que incluyen Genbank. Aquellos genes disponibles en el momento de presentar esta solicitud en el Genbank se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad así como para subsecuencias individuales contenidas en su interior. Se puede acceder al Genbank a través de

<http://www.ncbi.nih.gov/entrez/query.fcgi>. Los expertos en la materia entienden cómo resolver las discrepancias de secuencia y diferencias y ajustar las composiciones y métodos relacionados con una secuencia particular con respecto a otras secuencias relacionadas. Los cebadores o sondas pueden diseñarse para cualquier secuencia determinada dada la información descrita en la presente memoria y que se conoce en la técnica.

5

III. Ácidos Nucleicos Funcionales

[0180] El inhibidor de PAX2 del método proporcionado puede ser un ácido nucleico funcional. Los ácidos nucleicos funcionales son moléculas de ácido nucleico que tienen una función específica, tal como unión de una molécula diana o catalizar una reacción específica. Las moléculas de ácido nucleico funcionales pueden dividirse en las siguientes categorías, que no significa que sean limitantes. Por ejemplo, ácidos nucleicos funcionales incluyen moléculas antisentido, aptámeros, ribozimas, moléculas formadoras de triplex, ARNi y secuencias líder externas. Las moléculas de ácido nucleico funcionales pueden actuar como afectores, inhibidores, moduladores y estimuladores de una actividad específica poseída por una molécula diana, o las moléculas de ácidos nucleicos funcionales 15 pueden poseer una actividad *de novo* independiente de cualquier otra molécula.

[0181] Las moléculas de ácido nucleico funcional pueden interaccionar con cualquier macromolécula tal como ADN, ARN, polipéptidos o cadenas de hidratos de carbono. Por tanto, los ácidos nucleicos funcionales pueden interaccionar con el ARNm de PAX2 o con el ADN genómico de PAX2 o pueden interaccionar con el polipéptido 20 PAX2. Otros ácidos nucleicos funcionales se diseñan para interaccionar con otros ácidos nucleicos basándose en la homología de secuencia entre la molécula diana y la molécula de ácido nucleico funcional. En otras situaciones, el reconocimiento específico entre la molécula de ácido nucleico funcional y la molécula diana no está basado en la homología de secuencia entre la molécula de ácido nucleico funcional y la molécula diana, sino que en su lugar está 25 basado en la formación de la estructura terciaria que permite que pueda realizarse el reconocimiento específico.

25

[0182] Las moléculas antisentido se diseñan para interaccionar con una molécula de ácido nucleico diana mediante formación de pares de bases canónicas o no canónicas. La interacción de la molécula antisentido y la molécula diana se diseña para promover la destrucción de la molécula diana a través, por ejemplo, de degradación híbrida de ARN-ADN mediada por RNAsaH. Como alternativa, la molécula antisentido se diseña para interrumpir una función 30 de procesamiento que normalmente tendría lugar sobre la molécula diana tal como la transcripción o replicación. Las moléculas antisentido pueden diseñarse basando en la secuencia de la molécula diana. Existen numerosos métodos para la optimización de la eficacia antisentido mediante la búsqueda de las regiones más accesibles de la molécula diana. Los métodos ejemplares incluirían experimentos de selección *in vitro* y estudios de modificación de ADN usando DMS y DEPC. Se prefiere que las moléculas antisentido se unan a la molécula diana con una constante de 35 disociación (K_d) menor de o igual a 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} o 10^{-12} . Una muestra representativa de métodos y técnicas que ayudan a diseñar y usar moléculas antisentido puede encontrarse en las Patentes de Estados Unidos Nº: 5.135.917, 5.294.533, 5.627.158, 5.641.754, 5.691.317, 5.780.607, 5.786.138, 5.849.903, 5.856.103, 5.919.772, 5.955.590, 5.990.088, 5.994.320, 5.998.602, 6.005.095, 6.007.995, 6.013.522, 6.017.898, 6.018.042, 6.025.198, 6.033.910, 6.040.296, 6.046.004, 6.046.319 y 6.057.437.

40

[0183] Los aptámeros son moléculas que interaccionan con una molécula diana, preferentemente de una manera específica. Los aptámeros típicamente son pequeños ácidos nucleicos que varían de 15-50 bases de longitud que se pliegan en estructuras secundarias y terciarias definidas, tales como estructuras tallo-lazo o cuartetos G. Los aptámeros pueden unirse a moléculas pequeñas, tales como ATP (Patente de Estados Unidos Nº: 5.631.146) y teofilina (Patente de Estados Unidos Nº: 5.580.737), así como moléculas grandes, tal como transcriptasa inversa (Patente de Estados Unidos Nº: 5.786.462) y trombina (Patente de Estados Unidos Nº: 5.543.293). Los aptámeros pueden unirse muy estrechamente con valores K_d a partir de la molécula diana de menos de 10-12 M. Se prefiere que los aptámeros se unan a la molécula diana con una K_d menor de 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} o 10^{-12} . Los aptámeros pueden unirse a la molécula diana con un grado muy alto de especificidad. Por ejemplo, se han aislado aptámeros que 45 tienen una diferencia mayor de 10.000 veces en afinidades de unión entre la molécula diana y otra molécula que difiere solamente en una sola posición de la molécula (Patente de Estados Unidos Nº: 5.543.293). Se prefiere que el aptámero tenga una K_d con la molécula diana de al menos 10, 100, 1000, 10.000 o 100.000 veces inferior que la K_d con una molécula de unión de fondo. Esto se prefiere cuando se realiza la comparación para un polipéptido por ejemplo, la molécula de fondo es un polipéptido diferente. Pueden encontrarse ejemplos representativos de cómo 50 preparar y usar aptámeros para unirse a una diversidad de moléculas diana diferentes en las Patentes de Estados Unidos Nº: 5.476.766, 5.503.978, 5.631.146, 5.731.424, 5.780.228, 5.792.613, 5.795.721, 5.846.713, 5.858.660, 5.861.254, 5.864.026, 5.869.641, 5.958.691, 6.001.988, 6.011.020, 6.013.443, 6.020.130, 6.028.186, 6.030.776 y 6.051.698.

60 [0184] Las ribozimas son moléculas de ácido nucleico que son capaces de catalizar una reacción química, tanto intramolecular como intermolecularmente. Las ribozimas son por tanto ácido nucleico catalítico. Se prefiere que las ribozimas catalicen reacciones intermoleculares. Existen numerosos tipos diferentes de ribozimas que catalizan reacciones de tipo polimerasa de ácido nucleico o nucleasa que están basadas en ribozimas encontradas en sistemas naturales tales como ribozimas de cabeza de martillo, (Patentes de Estados Unidos Nº 5.334.711, 5.436.330, 5.616.466, 5.633.133, 5.646.020, 5.652.094, 5.712.384, 5.770.715, 5.856.463, 5.861.288, 5.891.683,

5.891.684, 5.985.621, 5.989.908, 5.998.193, 5.998.203; Solicitud de Patente Internacional Nº WO 9858058 por Ludwig y Sproat, documento WO 9858057 por Ludwig y Sproat y documento WO 9718312 por Ludwig y Sproat ribozimas en horquilla (por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nº 5.631.115, 5.646.031, 5.683.902, 5.712.384, 5.856.188, 5.866.701, 5.869.339 y 6.022.962) y ribozimas de tetrahymena (por ejemplo, Patentes de Estados Unidos 5 Nº 5.595.873 y 5.652.107). También existen numerosas ribozimas que no se encuentran en sistemas naturales, pero que se han modificado genéticamente para catalizar reacciones específicas *de novo* (por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nº 5.580.967, 5.688.670, 5.807.718 y 5.910.408). Las ribozimas preferidas escinden sustratos de ARN o ADN y más preferentemente escinden sustratos de ARN. Las ribozimas típicamente escinden sustratos de ácidos nucleicos mediante el reconocimiento y unión del sustrato diana con escisión posterior. Este reconocimiento 10 frecuentemente se basa principalmente en interacciones de pares de bases canónicas o no canónicas. Esta propiedad hace que las ribozimas sean particularmente buenas candidatas para la escisión específica diana de ácidos nucleicos debido a que el reconocimiento del sustrato diana se basa en la secuencia de los sustratos diana. Los ejemplos representativos de cómo realizar y usar ribozimas que catalicen una diversidad de diferentes 15 reacciones pueden encontrarse en las Patentes de Estados Unidos Nº 5.646.042, 5.693.535, 5.731.295, 5.811.300, 5.837.855, 5.869.253, 5.877.021, 5.877.022, 5.972.699, 5.972.704, 5.989.906 y 6.017.756.

[0185] Las moléculas de ácido nucleico funcional formadoras de triplex son moléculas que pueden interaccionar con ácido nucleico bicatenario o monocatenario. Cuando las moléculas triplex interaccionan con una región diana, se forma una estructura denominada un triplex, en la que existen tres cadenas de ADN formando un complejo 20 dependiente de formaciones de pares de bases de Watson-Crick y Hoogsteen. Las moléculas triplex se prefieren porque pueden unir regiones diana con alta afinidad y especificidad. Se prefiere que las moléculas formadoras de triplex se unan a la molécula diana con una K_d menor de 10-6, 10-8, 10-10 o 10-12. Los ejemplos representativos de cómo realizar y usar moléculas formadoras de triplex uniendo una diversidad de moléculas diana diferentes puede encontrarse en las Patentes de Estados Unidos Nº 5.176.996, 5.645.985, 5.650.316, 5.683.874, 5.693.773, 25 5.834.185, 5.869.246, 5.874.566 y 5.962.426.

[0186] Las secuencia guía externas (EGS) son moléculas que se unen a una molécula de ácido nucleico diana formadora de un complejo y este complejo se reconoce por la RNasa P, que escinde la molécula diana. Las EGS pueden diseñarse para dirigir específicamente una molécula de ARN de elección. La ARNasa P ayuda a procesar el 30 ARN de transferencia (ARNt) dentro de una célula. La ARNasa P bacteriana puede reclutarse para escindir prácticamente cualquier secuencia de ADN usando una EGS que haga que el complejo ARN:EGS diana imite el sustrato de ARNt natural (documento WO 92/03566 por Yale y Forster y Altman, Science 238: 407-409 (1990)).

[0187] De manera similar, la escisión dirigida por EGS/ARNasa P eucariota del ARN puede utilizarse para escindir 35 dianas deseadas dentro de células eucariotas. (Yuan *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 8006-8010 (1992); documento WO 93/22434 por Yale; documento WO 95/24489 por Yale; Yuan y Altman, EMBO J 14:159-168 (1995), y Carrara *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 92:2627-2631 (1995)). Ejemplos representativos de cómo realizar y usar moléculas de EGS para facilitar la escisión de una diversidad de diferentes moléculas diana puede encontrarse en las Patentes de Estados Unidos Nº 5.168.053, 5.624.824, 5.683.873, 5.728.521, 5.869.248 y 5.877.162.

40 **[0188]** La expresión de genes también puede silenciarse eficazmente de una manera altamente específica mediante el ARN de interferencia (ARNi). Este silenciamiento se observó originalmente con la adición de ARN bicatenario (ARNbc) (Fire, A., *et al.* (1998) Nature, 391: 806-11; Napoli, C., *et al.* (1990) Plant Cell 2:279-89; Hannon, G. J. (2002) Nature, 418:244-51). Una vez que el ARNbc entra en una célula, este se escinde por una enzima de tipo 45 RNasa III, Dicer, en los ARN de interferencia pequeños (ARNip) bicatenarios de 21-23 nucleótidos de longitud que contienen dos salientes nucleotídicos en los extremos 3' (Elbashir, S.M., *et al.* (2001) Genes Dev., 15: 188-200; Bernstein, E., *et al.* (2001) Nature, 409:363-6; Hammond, S.M., *et al.* (2000) Nature, 404:293-6). En una etapa dependiente de ATP, los ARNip comienzan a integrarse en un complejo de proteína multisubunitario, normalmente conocido como el complejo de silenciamiento inducido por ARNi (RISC), que guía a los ARNip a la secuencia de 50 ADN diana (Nykanen, A., *et al.* (2001) Cell, 107:309-21). En algún punto el dúplex de ARNip se desenrolla y parece que la cadena antisentido permanece unida a RISC y dirige la degradación de la secuencia de ARNm complementaria mediante una combinación de endo y exonucleasas (Martinez, J., *et al.* (2002) Cell, 110:563-74). Sin embargo, el efecto del ARNi o ARNip o su uso no se limita a ningún tipo de mecanismo.

55 **[0189]** El ARN de interferencia pequeño (ARNip) es un ARN bicatenario que puede inducir el silenciamiento génico postranscripcional específico de secuencia, disminuyendo por lo tanto o incluso inhibiendo la expresión génica. En un ejemplo, un ARNip desencadena la degradación específica de moléculas de ARN homólogas tales como ARNm, dentro de la región de identidad de secuencia entre tanto el ARNip como el ARN diana. Por ejemplo, el documento WO 02/44321 describe los ARNip capaces de degradación específica de secuencia de los ARNm diana cuando 60 forman pares de bases con extremos salientes 3', incorporado en la presente memoria por referencia para el método de realizar estos ARNip. El silenciamiento génico específico de secuencia puede conseguirse en células de mamífero usando los ARN bicatenarios, sintéticos que imitan los ARNip producidos por la enzima dicer (Elbashir, S.M., *et al.* (2001) Nature, 411:494 498) (Ui-Tei, K., *et al.* (2000) FEBS Lett 479:79-82). El ARNip puede sintetizarse químicamente o *in vitro* o puede ser el resultado de los ARN de tipo horquilla pequeños bicatenarios (ARNhp) que se 65 procesan en los ARNip dentro de la célula. Los ARNip sintéticos se diseñan generalmente usando algoritmos y un

sintetizador de ADN-ARN convencional. Los proveedores incluyen Ambion (Austin, Texas), ChemGenes (Ashland, Massachusetts), Dharmacon (Lafayette, Colorado), Glen Research (Sterling, Virginia), MWB Biotech (Esdersberg, Alemania), Proligo (Boulder, Colorado) y Qiagen (Vento, Países Bajos). El ARNip también puede sintetizarse *in vitro* usando kits tales como el Kit de Construcción de ARNip SILENCER® de Ambion. En la presente memoria se 5 describen cualquiera de los ARNip diseñados como se ha descrito anteriormente basándose en las secuencias para PAX2.

[0190] La producción de ARNip a partir de un vector se realiza más normalmente a través de la transcripción de los ARN en horquilla pequeños (ARNhp). Los kits para la producción de vectores que comprenden el ARNhp se 10 encuentran disponibles, tales como, por ejemplo, los Kits de Construcción GENESUPPRESSOR™ de Imgenex y los vectores de plásmidos y lentivirus de ARNi inducibles de BLOCK-IT™ de Invitrogen. En la presente memoria se describe cualquier ARNhp diseñado como se ha descrito anteriormente basándose en las secuencias para los mediadores inflamatorios descritos en la presente memoria.

15 6. Sistemas de Administración de Células

[0191] Existen diversas composiciones y procedimientos que pueden usarse para administrar ácidos nucleicos a células, tanto *in vitro* como *in vivo*. Estos métodos y composiciones pueden descomponerse en gran medida en dos clases: sistemas de administración basados en virus y sistemas de administración no basados en virus. Por ejemplo, 20 los ácidos nucleicos pueden administrarse mediante diversos sistemas de administración directos tal como, electroporación, lipofección, precipitación con fosfato de calcio, plásmidos, vectores virales, ácidos nucleicos virales, ácidos nucleicos de fagos, fagos, cósmidos o mediante transferencia de material genético en células o 25 transportadores tales como liposomas catiónicos. Los medios apropiados para la transfección, incluyendo vectores virales, transfectantes químicos o métodos fisicométricos tales como electroporación y difusión directa de ADN, se describen, por ejemplo, por Wolff, J. A., et al., Science, 247, 1465-1468, (1990); y Wolff, J. A. Nature, 352, 815-818, 30 (1991). Dichos métodos se conocen bien en la técnica y se encuentran fácilmente adaptables para su uso con las composiciones y métodos descritos en la presente memoria. En determinados casos, los métodos se modificarán para funcionar específicamente con grandes moléculas de ADN. Adicionalmente estos métodos pueden usarse para dirigir determinadas enfermedades y poblaciones de células usando las características diana del transportador.

30 i. Sistemas de suministro basados en ácido nucleico

[0192] Los vectores de transferencia pueden ser cualquier construcción de nucleótidos usada para suministrar genes a células (por ejemplo, un plásmido) o como parte de una estrategia general para suministrar genes, por ejemplo, 35 como parte de retrovirus o adenovirus recombinante (Ram et al. Cancer Res. 53:83-88, (1993)).

[0193] Como se usa en la presente memoria, los vectores plasmídicos o virales son agentes que transportan los ácidos nucleicos desvelados, tales como ARNip de PAX2 en la célula sin degradación e incluyen un promotor que proporciona la expresión del gen en las células a las que se suministra. En algunas realizaciones, los vectores se 40 obtienen de un virus o un retrovirus. Los vectores virales son, por ejemplo, Adenovirus, virus Adenoasociado, Herpes virus, virus Vaccinia, virus de la Polio, virus del SIDA, virus trófico neuronal, virus Sindbis y otros virus de ARN, incluyendo estos virus con la cadena principal del VIH. También se prefiere cualquier familia viral que comparta las propiedades de estos virus que hacen que sean adecuados para el uso como vectores. Los retrovirus incluyen el virus de la Leucemia de Maloney Murino, MMLV, y retrovirus que expresan las propiedades deseables de MMLV 45 como un vector. Los vectores retrovirales son capaces de llevar una mayor carga útil genética, es decir, un transgén o gen marcador, que otros vectores virales y por este motivo son un vector usado comúnmente. Sin embargo, no son tan útiles en células que no están proliferando. Los vectores de adenovirus son relativamente estables y es fácil trabajar con los mismos, tienen altos títulos y se pueden suministrar en formulación de aerosol y pueden transfectar células que no están en división. Los vectores virales de viruela son grandes y tienen varios sitios para insertar 50 genes, son termoestables y pueden almacenarse a temperatura ambiente. Una realización preferente es un vector viral que se ha modificado mediante ingeniería genética a fin de suprimir la respuesta inmune del organismo hospedador, provocada por los antígenos virales. Los vectores preferentes de este tipo llevarán regiones codificantes para interleucina 8 o 10.

55 [0194] Los vectores virales pueden tener mayores capacidades de transacción (capacidad de introducir genes) que los procedimientos químicos o físicos para introducir genes en células. Típicamente, los vectores virales contienen genes tempranos no estructurales, genes tardíos estructurales, un transcripto de ARN polimerasa III, repeticiones terminales invertidas necesarias para replicación y encapsidación y promotores para controlar la transcripción y replicación del genoma viral. Cuando se modifican mediante ingeniería genética como vectores, los virus típicamente 60 tienen eliminados uno o más de los genes tempranos y un gen o casete de gen/promotor se inserta en el genoma viral en lugar del ADN viral eliminado. Las construcciones de este tipo pueden llevar hasta aproximadamente 8 kb de material genético extraño. Las funciones necesarias de los genes tempranos eliminados se suministran típicamente por líneas celulares que se han modificado mediante ingeniería genética para expresar los productos génicos de los genes tempranos en trans.

a. Vectores Retrovirales

- [0195] Un retrovirus es un virus animal perteneciente a la familia de virus de Retroviridae, incluyendo cualquier tipo, subfamilia, género o tropismo. En general, los vectores retrovirales que están descritos por Verma, I.M., *Retroviral vectors for gene transfer*. En *Microbiology-1985*, American Society for Microbiology, págs. 229-232, Washington, (1985), que se incorpora en la presente memoria como referencia. Los ejemplos de procedimientos para usar vectores retrovirales para terapia génica están descritos en las Patentes de Estados Unidos Nº 4.868.116 y 4.980.286; las solicitudes PCT WO 90/02806 y WO 89/07136; y Mulligan, (*Science* 260:926-932 (1993)); cuyas enseñanzas se incorporan en la presente memoria como referencia.
- [0196] Un retrovirus es esencialmente un paquete que tiene empaquetado en el mismo un cargamento de ácido nucleico. El cargamento de ácido nucleico lleva con el mismo una señal de empaquetamiento, que garantiza que las moléculas hijas replicadas se empaquetarán de forma eficaz dentro de la cubierta del paquete. Además de la señal de empaquetamiento, existen varias moléculas que se necesitan en cis para la replicación y el empaquetamiento del virus replicado. Típicamente, un genoma retroviral contiene los genes gag, pol y env que están implicados en la preparación de la cubierta proteica. Son los genes gag, pol y env los que típicamente se sustituyen por el ADN extraño que se tiene que transferir a la célula diana. Los vectores de retrovirus típicamente contienen una señal de empaquetamiento para la incorporación a la cubierta del paquete, una secuencia que señala el inicio de la unidad de transcripción de gag, elementos necesarios para la transcripción inversa, que incluyen un sitio de unión a cebador para unirse al cebador de ARNt de la transcripción inversa, secuencias de repetición terminal que guían el cambio de cadena de ARN durante la síntesis de ADN, una secuencia rica en purina 5' del LTR 3' terminal que sirve como el sitio de cebado para la síntesis de la segunda cadena de la síntesis de ADN y secuencias específicas cerca de los extremos de las LTR que permiten la inserción del ADN expuesto de retrovirus para insertar en el genoma del hospedador. La eliminación de los genes gag, pol y env permite insertar aproximadamente 8 kb de secuencia extraña en el genoma viral, transcribirse de forma inversa y después de la replicación empaquetarse en una nueva partícula retroviral. Esta cantidad de ácido nucleico es suficiente para el suministro de uno a muchos genes dependiendo del tamaño de cada transcripto. Es preferible incluir marcadores de selección positivos o negativos junto con otros genes en el inserto.
- [0197] Ya que la maquinaria de replicación y las proteínas de empaquetamiento en la mayoría de los vectores retrovirales se han eliminado (gag, pol y env), los vectores se generan típicamente poniendo los mismos en una línea celular de empaquetamiento. Una línea celular de empaquetamiento es una línea celular que se ha transfectado o transformado con un retrovirus que contiene la maquinaria de replicación y empaquetamiento, pero que carece de una señal de empaquetamiento. Cuando el vector que lleva el ADN de elección se introduce mediante transfección en estas líneas celulares, el vector que contiene el gen de interés se replica y empaqueta en nuevas partículas retrovirales, mediante la maquinaria proporcionada en cis por la célula auxiliar. Los genomas para la maquinaria no se empaquetan debido a que carecen de las señales necesarias.

b. Vectores Adenovirales

- [0198] La construcción de adenovirus defectuosos en replicación se ha descrito (Berkner *et al.*, *J. Virology* 61: 1213-1220 (1987); Massie *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 6:2872-2883 (1986); Haj-Ahmad *et al.*, *J. Virology* 57:267-274 (1986); Davidson *et al.*, *J. Virology* 61:1226-1239 (1987); Zhang "Generation and identification of recombinant adenovirus by liposome-mediated transfection and PCR analysis" *Bio Techniques* 15:868-872 (1993)). El beneficio del uso de estos virus como vectores es que están limitados en el alcance en el que se puedan propagar a otros tipos celulares, ya que pueden replicarse dentro de una célula infectada inicial, pero son incapaces de formar nuevas partículas virales infecciosas. Se ha demostrado que los adenovirus recombinantes consiguen una transferencia génica de alta eficacia después de suministro directo *in vivo* al epitelio de las vías respiratorias, hepatocitos, endotelio vascular, parénquima del SNC y varios otros sitios tisulares (Morsy, *J. Clin. Invest.* 92:1580-1586 (1993); Kirshenbaum, *J. Clin. Invest.* 92:381-387 (1993); Roessler, *J. Clin. Invest.* 92:1085-1092 (1993); Moullier, *Nature Genetics* 4:154-159 (1993); La Salle, *Science* 259:988-990 (1993); Gomez-Foix, *J. Biol. Chem.* 267:25129-25134 (1992); Rich, *Human Gene Therapy* 4:461 -476 (1993); Zabner, *Nature Genetics* 6:75-83 (1994); Guzman, *Circulation Research* 73:1201-1207 (1993); Bout, *Human Gene Therapy* 5:3-10 (1994); Zabner, *Cell* 75:207-216 (1993); Caillaud, *Eur. J. Neuroscience* 5:1287-1291 (1993); y Ragot, *J. Gen. Virology* 74:501-507 (1993)). Los adenovirus recombinantes consiguen la transducción génica uniéndose a receptores de superficie celular específicos, después de lo cual se internaliza el virus mediante endocitosis mediada por receptor, del mismo modo que el adenovirus de tipo silvestre o defectuoso en replicación (Chardonnet y Dales, *Virology* 40: 462-477 (1970); Brown y Burlingham, *J. Virology* 12:386-396 (1973); Svensson y Persson, *J. Virology* 55:442-449 (1985); Seth, *et al.*, *J. Virol.* 51:650-655 (1984); Seth, *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 4:1528-1533 (1984); Varga *et al.*, *J. Virology* 65:6061-6070 (1991); Wickham *et al.*, *Cell* 60 73:309-319 (1993)).

[0199] Un vector viral puede ser uno basado en un adenovirus del que se ha eliminado el gen E1 y estos viriones se generan en una línea celular tal como la línea celular 293 humana. En otra realización preferida se han eliminado los genes tanto E1 como E3 del genoma de adenovirus.

c. Vectores virales adenoasociados

- [0200] Otro tipo de vector viral se basa en un virus adenoasociado (AAV). Este parvovirus defectuoso es un vector preferido debido a que puede infectar muchos tipos celulares y no es patógeno en seres humanos. Los vectores de tipo AAV pueden transportar de aproximadamente 4 a 5 kb y se sabe que el AAV de tipo silvestre se inserta de manera estable en el cromosoma 19. Se prefieren vectores que contienen esta propiedad de integración específica de sitio. Una realización especialmente preferida de este tipo de vector es el vector P4.1 C producido por Avigen, San Francisco, CA, que puede contener el gen de timidina quinasa del virus del herpes simple, HSV-tk, y/o un gen marcador, tal como el gen que codifica la proteína verde fluorescente, GFP.
- [0201] En otro tipo de virus AAV, el AAV contiene un par de repeticiones terminales invertidas (ITR), que flanquean al menos un casete que contiene un promotor que dirige la expresión específica de sitio ligada de forma operativa a un gen heterólogo. Heterólogo en este contexto se refiere a cualquier secuencia de nucleótidos o gen que no sea nativo del AAV o parvovirus B19.
- [0202] Típicamente, las regiones codificantes de AAV y B 19 se han delecionado, dando como resultado un vector seguro no citotóxico. Las ITR de AAV o modificaciones de las mismas otorgan infectividad e integración específica de sitio, pero no citotoxicidad, y el promotor dirige la expresión específica de célula. La Patente de Estados Unidos Nº 6.261.834 se incorpora en la presente memoria por referencia para material relacionado con el vector AAV.
- [0203] Los vectores desvelados proporcionan así moléculas de ADN que son capaces de integración en un cromosoma de mamífero sin sustancial toxicidad.
- [0204] Los genes insertados en virales y retrovirales contienen habitualmente promotores y/o potenciadores para ayudar a controlar la expresión del producto génico deseado. Un promotor generalmente es una secuencia o secuencias de ADN que funcionan cuando están en una localización relativamente fija con respecto al sitio de inicio de la transcripción. Un promotor contiene elementos centrales requeridos para la interacción básica de ARN polimerasa y factores de transcripción y puede contener elementos cadena arriba y elementos de respuesta.

30 d. Vectores virales de gran carga útil

- [0205] Los experimentos genéticos moleculares con herpesvirus humanos grandes han proporcionado un medio por el que se pueden clonar grandes fragmentos de ADN heterólogo, propagar y establecer en células permisivas para infección con herpesvirus (Sun *et al.*, Nature genetics 8: 33-41, 1994; Cotter y Robertson, Curr Opin Mol Ther 5: 633-644, 1999). Estos grandes virus ADN (virus del herpes simple (HSV) y virus de Epstein-Barr (EBV)), tienen el potencial de suministrar fragmentos de ADN heterólogo humano > 150 kb a células específicas. Los recombinantes de EBV pueden mantener grandes trozos de ADN en los linfocitos B infectados como ADN episómico. Los clones individuales que llevaban insertos genómicos humanos de hasta 330 kb parecían genéticamente estables. El mantenimiento de estos episomas requiere una proteína nuclear de EBV específica, EBNA1, expresada constitutivamente durante la infección con EBV. Adicionalmente, esos vectores se pueden usar para la transfección, donde se pueden generar grandes cantidades de proteína de forma transitoria *in vitro*. Los sistemas de amplificación de herpesvirus también se están usando para empaquetar trozos de ADN > 220 kb y para infectar células que pueden mantener de forma estable ADN como episomas.
- [0206] Otros sistemas útiles incluyen, por ejemplo, vectores de virus vaccinia en replicación y que no están en replicación restringidos a hospedador.

ii. Sistemas no basados en ácido nucleico

- [0207] Las composiciones desveladas se pueden suministrar a las células dianas de una diversidad de modos. Por ejemplo, las composiciones se pueden suministrar a través de electroporación o a través de lipofección o a través de precipitación con fosfato cálcico. El mecanismo de suministro elegido dependerá en parte del tipo de célula a la que se dirige y si el suministro está teniendo lugar, por ejemplo, *in vivo* o *in vitro*.
- [0208] Así, las composiciones pueden comprender lípidos tales como liposomas, tales como liposomas catiónicos (por ejemplo, DOTMA, DOPE, DC-colesterol) o liposomas aniónicos. Los liposomas pueden comprender adicionalmente proteínas para facilitar el direccionamiento a una célula particular, si se desea. La administración de una composición que comprende un compuesto y un liposoma catiónico se puede administrar a la sangre aferente a un órgano diana o inhalarse en las vías respiratorias a células diana de las vías respiratorias. Con respecto a los liposomas, véase, por ejemplo, Brigham *et al.* Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol. 1:95-100 (1989); Feigner *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci USA 84:7413-7417 (1987); Patente de Estados Unidos Nº 4.897.355. Además, el compuesto se puede administrar como un componente de una microcápsula que se puede dirigir a tipos celulares específicos, tales como macrófagos, o donde la difusión del compuesto o el suministro del compuesto de la microcápsula está diseñado para una velocidad o dosificación específica.

- [0209]** En los procedimientos que se han descrito anteriormente que incluyen la administración y captación de ADN exógeno en las células de un sujeto (es decir, transducción o transfección génica), el suministro de las composiciones a células puede ser a través de una diversidad de mecanismos. Como un ejemplo, el suministro puede ser a través de un liposoma, usando preparaciones de liposomas disponibles en el mercado tales como 5 LIPOFECTIN, LIPOFECTAMINE (GIBCO-BRL, Inc., Gaithersburg, MD), SUPERFECT (Qiagen, Inc. Hilden, Alemania) y TRANSFECTAM (Promega Biotec, Inc., Madison, WI), así como otros liposomas desarrollados de acuerdo con procedimientos convencionales en la técnica. Además, el ácido nucleico o vector desvelado se puede suministrar *in vivo* mediante electroporación, para lo que está disponible la tecnología en Genetronics, Inc. (San Diego, CA) así como mediante una máquina de SONOPORATION (ImaRx Pharmaceutical Corp., Tucson, AZ).
- 10 **[0210]** Los materiales pueden estar en solución, suspensión (por ejemplo, incorporadas en macropartículas, liposomas o células). Estos se pueden dirigir a un tipo celular particular a través de anticuerpos, receptores o ligandos de receptor. Las siguientes referencias son ejemplos del uso de esta tecnología para abordar proteínas específicas de tejido tumoral (Senter, *et al.*, Bioconjugate Chem., 2:447-451, (1991); Bagshawe, K.D., Br. J. Cancer, 15 60:275-281, (1989); Bagshawe, *et al.*, Br. J. Cancer, 58: 700-703, (1988); Senter, *et al.*, Bioconjugate Chem., 4:3-9, (1993); Battelli, *et al.*, Cancer Immunol. Immunother., 35: 421-425, (1992); Pietersz and McKenzie, Immunolog. Reviews, 129:57-80, (1992); y Roffler, *et al.*, Biochem. Pharmacol, 42:2062-2065, (1991)). Estas técnicas se pueden usar para una diversidad de otros tipos celulares específicos. Vehículos tales como "stealth" y otros liposomas conjugados con anticuerpos (incluyendo direccionamiento de fármaco mediado por lípido a carcinoma colónico), 15 dirección mediado por receptor de ADN a través de ligandos específicos de células, direccionamiento a tumor dirigido por linfocitos y direccionamiento retroviral altamente específico de células de glioma murino *in vivo*. Las siguientes referencias son ejemplos del uso de esta terminología para dirigir proteínas específicas a tejido tumoral (Hughes *et al.*, Cancer Research, 49:6214-6220, (1989); y Litzinger y Huang, Biochimica et Biophysica Acta, 1104:179-187, (1992)). En general, los receptores están implicados en rutas de endocitosis, 20 constitutivas o inducidas por ligando. Estos receptores se agrupan en fosos recubiertos con clatrina, entran en la célula a través de vesículas recubiertas con clatrina, pasan a través de un endosoma acidificado en el que se clasifican los receptores y después se reciclan en la superficie celular, se almacenan intracelularmente o se degradan en lisosomas. Las rutas de internalización sirven para una diversidad de funciones, tales como la captación de nutrientes, eliminación de proteínas activadas, aclaramiento de macromoléculas, entrada oportunista 25 30 de virus y toxinas, disociación y degradación de ligando y regulación a nivel de receptor. Muchos receptores siguen más de una ruta intracelular, dependiendo del tipo celular, la concentración del receptor, el tipo de ligando, la valencia de ligando y la concentración de ligando. Los mecanismos moleculares y celulares de la endocitosis mediada por receptor se han revisado (Brown y Greene, DNA and Cell Biology 10:6, 399-409 (1991)).
- 35 **[0211]** Los ácidos nucleicos que se suministran a células que se tienen que integrar en el genoma de la célula hospedadora contienen típicamente secuencias de integración. Estas secuencias con frecuencia son secuencias relacionadas con virus, particularmente cuando se usan sistemas basados en virus. Estos sistemas de integración viral pueden incorporarse también en ácidos nucleicos que se tienen que suministrar usando un sistema de suministro no basado en ácido nucleico, tal como un liposoma, de tal manera que el ácido nucleico contenido en el 40 sistema de suministro se pueda integrar en el genoma del hospedador.
- 45 **[0212]** Otras técnicas generales para la integración en el genoma del hospedador incluyen, por ejemplo, sistemas diseñados para promover la recombinación homóloga con el genoma del hospedador. Estos sistemas típicamente dependen de secuencias que flanquean el ácido nucleico a expresar que tiene suficiente homología con una secuencia diana dentro del genoma de la célula hospedadora de tal manera que tiene lugar la recombinación entre el ácido nucleico del vector y el ácido nucleico diana, causando que el ácido nucleico suministrado se integre en el genoma del hospedador. Estos sistemas y los procedimientos necesarios para promover la recombinación homóloga se conocen por los expertos en la materia.
- 50 **iii. *In vivo/ex vivo***
- [0213]** Como se ha descrito anteriormente, las composiciones se pueden administrar en un vehículo farmacéuticamente aceptable y se pueden suministrar a las células del sujeto *in vivo* y/o *ex vivo* mediante una diversidad de mecanismos bien conocidos en la técnica (por ejemplo, captación de ADN desnudo, fusión de 55 liposomas, inyección intramuscular de ADN a través de una pistola de genes, endocitosis y similares).
- [0214]** Si se emplean procedimientos *ex vivo*, se pueden eliminar células o tejidos y mantenerse en el exterior del cuerpo de acuerdo con protocolos convencionales bien conocidos en la técnica. Las composiciones se pueden introducir en las células mediante cualquier mecanismo de transferencia génica, tal como, por ejemplo, suministro de 60 genes mediado por fosfato cálcico, electroporación, microinyección o proteoliposomas. Después, las células transducidas se pueden infundir (por ejemplo, en un vehículo farmacéuticamente aceptable) o trasplantarse homotópicamente de vuelta al sujeto mediante procedimientos convencionales por el tipo celular o tisular. Se conocen procedimientos convencionales para el trasplante o la infusión de diversas células a un sujeto.

7. Kits

[0215] Los materiales que se han descrito anteriormente así como otros materiales se pueden envasar de forma conjunta en cualquier combinación adecuada como un kit útil para realizar o ayudar en la realización del procedimiento desvelado. Es útil que los componentes del kit en un kit dado estén diseñados y adaptados para su uso de forma conjunta en el procedimiento desvelado. Por ejemplo, se desvelan kits para detectar, tratar o prevenir cáncer de próstata o PIN, comprendiendo el kit péptidos o anticuerpos que unen específicamente a PAX2 y DEFB1.

8. Sistemas de expresión

10

[0216] Los ácidos nucleicos que se suministran a células contienen típicamente sistemas de control de expresión. Por ejemplo, los genes insertados en sistemas virales y retrovirales contienen habitualmente promotores y/o potenciadores para ayudar a controlar la expresión del producto génico deseado. Un promotor generalmente es una secuencia o secuencias de ADN que funcionan cuando están en una localización relativamente fija con respecto al sitio de inicio de la transcripción. Un promotor contiene elementos centrales requeridos para la interacción básica de ARN polimerasa y factores de transcripción y puede contener elementos cadena arriba y elementos de respuesta.

i. Promotores y Potenciadores Virales

20 [0217] Los promotores preferentes que controlan la transcripción de vectores en células hospedadoras de mamífero se pueden obtener de diversas fuentes, por ejemplo, los genomas de virus tales como: polioma, Virus de simio 40 (SV40), adenovirus, retrovirus, virus de la hepatitis B y mucho más preferentemente citomegalovirus, o de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de beta actina. Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen de forma conveniente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación viral de SV40 (Fiers *et al.*, Nature, 273: 113 (1978)). El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene de forma conveniente como un fragmento de restricción con HindIII E (Greenway, P.J. *et al.*, Gene 18: 355-360 (1982)). Por supuesto, en la presente memoria también son útiles promotores de la célula hospedadora o especies relacionadas.

30 [0218] Un potenciador se refiere generalmente a una secuencia de ADN que funciona a ninguna distancia fija del sitio de inicio de la transcripción y puede ser 5' (Laimins, L. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 993 (1981)) o 3' (Lusky, M.L., *et al.*, Mol. Cell Bio. 3: 1108 (1983)) a la unidad de transcripción. Además, los potenciadores pueden estar dentro de un intrón (Banerji, J.L. *et al.*, Cell 33: 729 (1983)) así como dentro de la propia secuencia codificante (Osborne, T.F., *et al.*, Mol. Cell Bio. 4: 1293 (1984)). Habitualmente tienen entre 10 y 300 pb de longitud y funcionan en cis. Los potenciadores funcionan aumentando la transcripción de promotores cercanos. Los potenciadores también contienen con frecuencia elementos de respuesta que median en la regulación de la transcripción. Los promotores pueden contener también elementos de respuesta que median en la regulación de la transcripción. Los potenciadores determinan con frecuencia la regulación de expresión de un gen. Aunque muchas secuencias potenciadoras se conocen ahora de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, fetoproteína e insulina), típicamente se usará un potenciador de un virus de célula eucariota para la expresión general. Son ejemplos preferentes el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus.

45 [0219] El promotor y/o potenciador se pueden activar específicamente mediante luz o acontecimientos químicos específicos que desencadenan su función. Los sistemas se pueden regular mediante reactivos tales como tetraciclina y dexametasona. También existen modos de aumentar la expresión génica del vector viral mediante exposición a irradiación, tal como irradiación gamma o fármacos de quimioterapia alquilantes.

50 [0220] En ciertas realizaciones, la región de promotor y/o potenciador puede actuar como un promotor y/o potenciador constitutivo para maximizar la expresión de la región de la unidad de transcripción a transcribir. En ciertas construcciones, la región del promotor y/o potenciador será activa en todos los tipos celulares eucariotas incluso si se expresa solamente en un tipo particular de célula en un momento particular. Un promotor preferente de este tipo es el promotor de CMV (650 bases). Otros promotores preferentes son los promotores de SV40, 55 citomegalovirus (promotor de longitud completa) y vector retroviral (LTR).

[0221] Se ha demostrado que todos los elementos reguladores específicos se pueden clonar y usar para construir vectores de expresión que se expresan selectivamente en tipos celulares específicos tales como células de melanoma. El promotor de la proteína acética fibrilar glial (GFAP) se ha usado para expresar selectivamente genes 60 en células de origen glial.

[0222] Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas (células de levadura, hongos, insecto, vegetales, animales, humanas o nucleadas) pueden contener también secuencias necesarias para la terminación de la transcripción que pueden afectar a la expresión de ARNm. Estas regiones se transcriben como segmentos 65 poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica la proteína de factor tisular. Las regiones no

traducidas 3' también incluyen sitios de terminación de la transcripción. Se prefiere que la unidad de transcripción contenga también una región de poliadenilación. Un beneficio de esta región es que aumenta la probabilidad de que la unidad transcrita se procese y transporte como el ARNm. La identificación y el uso de señales de poliadenilación en construcciones de expresión están bien establecidos. Se prefiere que se usen señales de poliadenilación 5 homólogas en las construcciones de transgenes. En ciertas unidades de transcripción, la región de poliadenilación se obtiene de la señal de poliadenilación temprana de SV40 y consiste en aproximadamente 400 bases. También se prefiere que la unidad transcrita contenga otras secuencias convencionales en solitario o en combinación con las anteriores secuencias que mejoran la expresión de o la estabilidad de la construcción.

10 ii. Marcadores

[0223] Los vectores virales pueden incluir una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto marcador. Este producto marcador se usa para determinar si el gen se ha suministrado a la célula y si, una vez suministrado, se está expresando. Son genes marcadores preferentes el gen lacZ de *E. coli*, que codifica β-galactosidasa y proteína 15 fluorescente verde.

[0224] En algunas realizaciones, el marcador puede ser un marcador de selección. Los ejemplos de marcadores de selección adecuados para células de mamíferos son dihidrofolato reductasa (DHFR), timidina quinasa, neomicina, análogo de neomicina G418, hidromicina y puromicina. Cuando tales marcadores de selección se transfieren de 20 forma exitosa a una célula hospedadora de mamífero, la célula hospedadora de mamífero transformada puede sobrevivir si se pone bajo presión selectiva. Existen dos categorías ampliamente usadas distintas de regímenes selectivos. La primera categoría está basada en el metabolismo de una célula y el uso de una línea celular mutante que carece de la capacidad de crecer independientemente de un medio complementado. Dos ejemplos son: células DHFR de CHO y células LTK de ratón. Estas células carecen de la capacidad de crecer sin la adición de tales 25 nutrientes tales como timidina o hipoxantina. Debido a que estas células carecen de ciertos genes necesarios para una ruta de síntesis de nucleótidos completa, no pueden sobrevivir a menos que se proporcionen los nucleótidos ausentes en un medio complementado. Una alternativa a complementar el medio es introducir un gen de DHFR o TK intacto en células que carezcan de los genes respectivos, alterando así sus requisitos de crecimiento. Las células individuales que no se han transformado con el gen de DHFR o TK no serán capaces de sobrevivir en medio no 30 complementado.

[0225] La segunda categoría es selección dominante que se refiere a un esquema de selección usado en cualquier tipo celular y no requiere el uso de ninguna línea celular mutante. Estos esquemas usan típicamente un fármaco para bloquear el crecimiento de una célula hospedadora. Esas células que tienen un gen novedoso expresarían una 35 proteína que lleva resistencia a fármacos y sobrevivirían a la selección. Los ejemplos de tal selección dominante usan los fármacos neomicina (Southern P. y Berg, P., J. Molec. Appl. Genet. 1: 327 (1982)), ácido micofénlico (Mulligan, R.C. and Berg, P. Science 209:1422 (1980)) o higromicina (Sugden, B. et al., Mol. Cell. Biol. 5: 410-413 (1985)). Los tres ejemplos emplean genes bacterianos bajo control eucariota para otorgar resistencia al fármaco apropiado G418 o neomicina (geneticina), xgpt (ácido micofénlico) o higromicina, respectivamente. Otros incluyen 40 el análogo de neomicina G418 y puromicina.

9. Vehículos farmacéuticos

[0226] Las composiciones desveladas se pueden usar terapéuticamente en combinación con un vehículo 45 farmacéuticamente aceptable. Con "farmacéuticamente aceptable" se quiere decir un material que no es indeseable biológicamente o de otro modo, es decir, el material se puede administrar a un sujeto junto con el ácido nucleico o vector sin causar ningún efecto biológico indeseable o interaccionar de un modo perjudicial con cualquiera de los demás componentes de la composición farmacéutica en la que está contenido. El vehículo de forma natural se seleccionará para minimizar cualquier degradación del ingrediente activo y para minimizar cualquier efecto 50 secundario adverso en el sujeto, como se conoce bien por el experto en la materia.

[0227] Están descritos vehículos adecuados y sus formulaciones en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (19^a ed.) ed. A.R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA 1995. Típicamente, una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable se usa en la formulación para convertir la formulación en 55 isotónica. Los ejemplos del vehículo farmacéuticamente aceptable incluyen, pero sin limitación, solución salina, solución de Ringer y solución de dextrosa. El pH de la solución es preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 8 y más preferentemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5. Otros vehículos incluyen preparaciones de liberación sostenida tales como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, 60 liposomas o micropartículas. Será evidente para los expertos en la materia que ciertos vehículos pueden ser más preferentes dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración y la concentración de la composición que se está administrando.

[0228] Los vehículos farmacéuticos se conocen por los expertos en la materia. Los más típicos serían vehículos 65 convencionales para la administración de fármacos a seres humanos, que incluyen soluciones tales como agua

estéril, solución salina y soluciones tamponadas a pH fisiológico. Las composiciones se pueden administrar por vía intramuscular o por vía subcutánea. Se administrarán otros compuestos de acuerdo con procedimientos convencionales usados por los expertos en la materia.

- 5 [0229] Las composiciones farmacéuticas pueden incluir vehículos, espesantes, diluyentes, tampones, conservantes, agentes con actividad superficial y similares además de la molécula de elección. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir también uno o más ingredientes activos tales como agentes antimicrobianos, agentes antiinflamatorios, anestésicos y similares.
- 10 [0230] Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones acuosas o no acuosas estériles, suspensiones y emulsiones. Son ejemplos de disolventes no acuosos propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medio tamponado. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y 15 cloruro sódico, Ringer lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen rellenadores de fluidos y nutrientes, rellenadores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer) y similares. Pueden estar presentes también conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares.
- 20 [0231] Las formulaciones para administración tópica pueden incluir pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, pulverizadores, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares.
- [0232] Las composiciones para administración oral incluyen polvos o gránulos, suspensiones o soluciones en agua o 25 medio no acuoso, cápsulas, sobrecitos o comprimidos. Pueden ser deseables espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, ayudas de dispersión o aglutinantes.
- [0233] Algunas de las composiciones pueden administrarse potencialmente como una sal farmacéuticamente aceptable de adición de ácido o base, formada mediante reacción con ácidos inorgánicos tales como ácido 30 clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido tiociánico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico, y ácidos orgánicos tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico y ácido fumárico o mediante reacción con una base inorgánica tal como hidróxido sódico, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio y bases orgánicas tales como mono-, di-, trialquil y aril aminas y etanolaminas sustituidas.
- 35 [0234] Los materiales pueden estar en solución, suspensión (por ejemplo, incorporados en micropartículas, liposomas o células). Estos se pueden dirigir a un tipo celular particular mediante anticuerpos, receptores o ligandos de receptor. Las siguientes referencias son ejemplos del uso de esta tecnología para dirigir proteínas específicas a tejido tumoral (Senter, *et al.*, Bioconjugate Chem., 2:447-451, (1991); Bagshawe, K.D., Br. J. Cancer, 60:275-281, 40 (1989); Bagshawe, *et al.*, Br. J. Cancer, 58: 700-703, (1988); Senter, *et al.*, Bioconjugate Chem., 4:3-9, (1993); Battelli, *et al.*, Cancer Immunol. Immunother., 35: 421-425, (1992); Pietersz and McKenzie, Immunolog. Reviews, 129:57-80, (1992); y Roffler, *et al.*, Biochem. Pharmacol., 42:2062-2065, (1991)). Vehículos tales como "stealth" y otros liposomas conjugados con anticuerpo (incluyendo direccionamiento de fármaco mediado por lípido a carcinoma colónico), direccionamiento mediado por receptor de ADN a través de ligandos específicos celulares, 45 dirección a tumor dirigido por linfocitos y direccionamiento retroviral terapéutico altamente específico de células de glioma murino *in vivo*. Las siguientes referencias son ejemplos del uso de esta tecnología para dirigir proteínas específicas a tejido tumoral (Hughes *et al.*, Cancer Research, 49:6214-6220, (1989); y Litzinger y Huang, Biochimica et Biophysica Acta, 1104:179-187, (1992)). En general, los receptores están implicados en rutas de endocitosis, constitutivas o inducidas por ligando. Estos receptores se agrupan en fosos recubiertos de clatrina, 50 entran en la célula a través de vesículas recubiertas con clatrina, pasan a través de un endosoma acidificado en el que se clasifican los receptores y después se recilan a la superficie celular, se almacenan intracelularmente o se degradan en lisosomas. Las rutas de internalización sirven para una diversidad de funciones, tales como captación de nutrientes, eliminación de proteínas activadas, aclaramiento de macromoléculas, entrada oportunista de virus y toxinas, disociación y degradación de ligando y regulación al nivel del receptor. Muchos receptores siguen más de 55 una ruta intracelular, dependiendo del tipo celular, concentración de receptor, tipo de ligando, valencia de ligando y concentración de ligando. Se han revisado los mecanismos moleculares y celulares de la endocitosis mediada por receptor (Brown y Greene, DNA and Cell Biology 10:6, 399-409 (1991)).

10. Química combinatoria

- 60 [0235] Las composiciones desveladas se pueden usar como dianas para cualquier técnica combinatoria para identificar moléculas o moléculas macromoleculares que interactúen con las composiciones desveladas de una forma deseada. También se desvelan las composiciones que se identifican a través de técnicas combinatorias o técnicas de exploración en las que las composiciones desveladas como la secuencia de PAX2 o partes de la misma

(por ejemplo, dominio de unión a ADN de PAX2) se usan como la diana en un protocolo combinatorio o de exploración.

5 [0236] Se entiende que cuando se usan las composiciones desveladas en técnicas combinatorias o procedimientos de exploración se identificarán moléculas, tales como moléculas macromoleculares, que tengan propiedades deseadas particulares tales como inhibición o estimulación de la función de la molécula diana. Las moléculas identificadas y aisladas cuando se usan las composiciones desveladas tales como DEFB1 o PAX2 también se desvelan. Así, los productos producidos usando las estrategias combinatorias o de exploración que implican las composiciones desveladas también se consideran desvelados en la presente memoria.

10

[0237] Se entiende que los procedimientos desvelados para identificar moléculas que inhiben las interacciones entre, por ejemplo, el promotor de DEFB1 y PAX2 se pueden realizar usando medios de alto rendimiento. Por ejemplo, se pueden identificar supuestos inhibidores usando transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) para identificar rápidamente interacciones. La teoría subyacente de las técnicas es que cuando 15 dos moléculas están próximas en el espacio, es decir, interactúan a un nivel por debajo del fondo, se produce una señal o se puede interrumpir una señal. Después se pueden realizar una diversidad de experimentos que incluyen, por ejemplo, añadir un supuesto inhibidor. Si el inhibidor compite con la interacción entre las dos moléculas de señalización, las señales se eliminarán una de otra en el espacio y esto causará una disminución o un aumento de la señal, dependiendo del tipo de señal usado. Esta señal de disminución o creciente puede correlacionarse con la presencia o ausencia de supuesto inhibidor. Se puede usar cualquier medio de señalización. Por ejemplo, se desvelan procedimientos de identificación de un inhibidor de la interacción entre cualquiera de dos de las moléculas desveladas que comprenden poner en contacto una primera molécula y una segunda molécula de forma conjunta en 20 presencia de un supuesto inhibidor, en el cual la primera molécula o la segunda molécula comprende un donador de fluorescencia, en el cual la primera o segunda molécula, típicamente la molécula que no comprende el donador, comprende un aceptor de fluorescencia; y medir la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) 25 en presencia de supuesto inhibidor y en ausencia de supuesto inhibidor, en el que una disminución en FRET en la presencia del supuesto inhibidor en comparación con la medición de FRET en su ausencia indica que el supuesto inhibidor inhibe la unión entre las dos moléculas. Este tipo de procedimiento se puede realizar asimismo con un sistema celular.

30

[0238] La química combinatoria incluye, pero sin limitación, todos los procedimientos para aislar pequeñas moléculas o macromoléculas que sean capaces de unirse a una molécula pequeña o a otra macromolécula, típicamente en un procedimiento iterativo. Son ejemplos de macromoléculas las proteínas, oligonucleótidos y azúcares. Por ejemplo, las moléculas de oligonucleótidos con una función dada, catalítica o de unión a ligando, se 35 pueden aislar de una mezcla compleja de oligonucleótidos aleatorios en lo que se ha denominado "genética *in vitro*" (Szostak, TIBS 19:89, 1992). Se sintetiza un gran grupo de moléculas que llevan secuencias aleatorias y definidas y se somete esa mezcla compleja, por ejemplo, aproximadamente 10^{15} secuencias individuales a 100 µg de un ARN de 100 nucleótidos a algún procedimiento de selección y enriquecimiento. Mediante ciclos repetidos de cromatografía de afinidad y amplificación mediante PCR de las moléculas unidas al ligando en la columna, Ellington 40 y Szostak (1990) estimaron que una de 10^{10} moléculas de ARN se plegaron de tal manera que se unían a un colorante de molécula pequeña. También se han aislado moléculas de ADN con tal comportamiento de unión a ligando (Ellington y Szostak, 1992; Bock *et al.*, 1992). Existen técnicas que pretenden objetivos similares para 45 pequeñas moléculas orgánicas, proteínas, anticuerpos y otras macromoléculas conocidas por los expertos en la materia. Los conjuntos de exploración de moléculas para una actividad deseada basada en pequeñas bibliotecas orgánicas, oligonucleótidos o anticuerpos se denominan de forma general química combinatoria. Las técnicas combinatorias son particularmente adecuadas para definir interacciones de unión entre moléculas y para aislar moléculas que tengan una actividad de unión específica, denominadas con frecuencia aptámeros cuando las 50 macromoléculas son ácidos nucleicos.

50 [0239] Existen varios procedimientos para aislar proteínas que tienen actividad *de novo* o una actividad modificada. Por ejemplo, se han usado bibliotecas de presentación en fagos para aislar numerosos péptidos que interactúan con una diana específica (véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nº 6.031.071; 5.824.520; 5.596.079; y 5.565.332, que se incorporan en la presente memoria como referencia al menos para su material relacionado con presentación en fagos y procedimientos relacionados con química combinatoria).

55

[0240] Un procedimiento preferente para aislar proteínas que tienen una función dada se describe por Roberts y Szostak (Roberts R.W. y Szostak J.W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(23)12997-302 (1997)). Este procedimiento de química combinatoria acopla el poder funcional de proteínas y el poder genético de ácidos nucleicos. Se genera una molécula de ARN en la que una molécula de puromicina se une covalentemente al extremo 3' de la molécula de 60 ARN. Una traducción *in vitro* de esta molécula de ARN modificada causa que se traduzca la proteína correcta codificada por el ARN. Además, debido a la unión de la puromicina, un aceptor de peptidilo que no se puede extender, una cadena peptídica en crecimiento se une a la puromicina que está unida al ARN. Así, la molécula proteica se une al material genético que la codifica. Ahora se pueden realizar procedimientos de selección *in vitro* normales para aislar los péptidos funcionales. Una vez que se ha completado el procedimiento de selección para 65 función peptídica se realizan procedimientos de manipulación de ácido nucleico tradicionales para amplificar el ácido

nucleico que codifica los péptidos funcionales seleccionados. Después de la amplificación del material genético, se transcribe nuevo ARN con puromicina en el extremo 3', se traduce el nuevo péptido y se realiza otra ronda de selección funcional. Así, la selección de proteínas se puede realizar de una manera iterativa justo como las técnicas de selección de ácido nucleico. El péptido que se traduce se controla por la secuencia del ARN unido a la 5 puromicina. Esta secuencia puede ser cualquier cosa desde una secuencia aleatoria modificada mediante ingeniería genética para traducción óptima (es decir, sin codones de terminación, etc.) o puede ser una secuencia degenerada de una molécula de ARN conocida para buscar función mejorada o alterada de un péptido conocido. Las condiciones para la amplificación y traducción *in vitro* de ácido nucleico se conocen bien por los expertos habituales en la materia y se realiza preferentemente como en Roberts y Szostak (Roberts R.W. y Szostak J.W. Proc. Natl. 10 Acad. Sci. USA, 94(23)12997-302 (1997)).

[0241] Otro procedimiento preferente para procedimientos combinatorios diseñados para aislar péptidos se describe en Cohen *et al.* (Cohen B.A., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(24): 14272-7 (1998)). Este procedimiento utiliza y modifica la tecnología de dos híbridos. Los sistemas de dos híbridos en levadura son útiles para la detección y el 15 análisis de interacciones proteína:proteína. El sistema de dos híbridos, descrito inicialmente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, es una técnica genética molecular potente para identificar nuevas moléculas reguladoras, específicas para la proteína de interés (Fields y Song, Nature 340:245-6 (1989)). Cohen *et al.*, modificaron esta tecnología de tal manera que se pueden identificar interacciones novedosas entre secuencias peptídicas sintéticas o modificadas mediante ingeniería genética que se unen a molécula de elección. El beneficio de 20 este tipo de tecnología es que la selección se realiza en un entorno intracelular. El procedimiento utiliza una biblioteca de moléculas peptídicas que se unen a un dominio de activación ácido.

[0242] Usando la metodología bien conocida por los expertos en la materia, en combinación con diversas bibliotecas combinatorias, se puede aislar y caracterizar las moléculas pequeñas o macromoléculas, que se unen a o 25 interaccionan con la diana deseada. La afinidad de unión relativa de sus compuestos se puede comparar y se pueden identificar compuestos óptimos usando estudios de unión competitiva que se conocen bien por los expertos en la materia.

[0243] Las técnicas para preparar bibliotecas combinatorias y explorar bibliotecas combinatorias para aislar 30 moléculas que se unen a diana deseada se conocen bien por los expertos en la materia. Se pueden encontrar técnicas y procedimientos representativos en, pero sin limitación, las Patentes de Estados Unidos Nº 5.084.824, 5.288.514, 5.449.754, 5.506.337, 5.539.083, 5.545.568, 5.556.762, 5.565.324, 5.565.332, 5.573.905, 5.618.825, 5.619.680, 5.627.210, 5.646.285, 5.663.046, 5.670.326, 5.677.195, 5.683.899, 5.688.696, 5.688.997, 5.698.685, 5.712.146, 5.721.099, 5.723.598, 5.741.713, 5.792.431, 5.807.683, 5.807.754, 5.821.130, 5.831.014, 5.834.195, 35 5.834.318, 5.834.588, 5.840.500, 5.847.150, 5.856.107, 5.856.496, 5.859.190, 5.864.010, 5.874.443, 5.877.214, 5.880.972, 5.886.126, 5.886.127, 5.891.737, 5.916.899, 5.919.955, 5.925.527, 5.939.268, 5.942.387, 5.945.070, 5.948.696, 5.958.702, 5.958.792, 5.962.337, 5.965.719, 5.972.719, 5.976.894, 5.980.704, 5.985.356, 5.999.086, 6.001.579, 6.004.617, 6.008.321, 6.017.768, 6.025.371, 6.030.917, 6.040.193, 6.045.671, 6.045.755, 6.060.596 y 6.061.636.

[0244] Se pueden preparar bibliotecas combinatorias a partir de una amplia serie de moléculas usando varias 40 técnicas sintéticas diferentes. Por ejemplo bibliotecas que contienen 2,4-pirimidinedionas fusionadas (patente de Estados Unidos 6.025.371), dihidrobenzopiranos (patentes de Estados Unidos 6.017.768 y 5.821.130), alcoholes de amida (patente de Estados Unidos 5.976.894), amidas de hidroxi-amino ácidos (patente de Estados Unidos 5.972.719), hidratos de carbono (patente de Estados Unidos 5.965.719), 1,4-benzodiazepina-2,5-dionas (patente de Estados Unidos 5.962.337), cíclicos (patente de Estados Unidos 5.958.792), amidas de amino ácido de biarilo (patente de Estados Unidos 5.948.696), tiofenos (patente de Estados Unidos 5.942.387), tetrahidroquinolinas tricíclicas (patente de Estados Unidos 5.925.527), benzofuranos (patente de Estados Unidos 5.919.955), isoquinolinas (patente de Estados Unidos 5.916.899), hidantoína y tiohidantoína (patente de Estados Unidos 5.859.190), indoles (patente de Estados Unidos 5.856.496), imidazol-pirido-indol e imidazol-pirido-benzotiofenos (patente de Estados Unidos 5.856.107), 2-metileno-2, 3-dihidrotiazoles sustituidos (patente de Estados Unidos 5.847.150), quinolinas (patente de Estados Unidos 5.840.500), marcadores que contienen PNA (patente de Estados Unidos 5.831.014), (patente de Estados Unidos 5.721.099), policetonas (patente de Estados Unidos 5.712.146), subunidades de morfolino (patentes de Estados Unidos 5.698.685 y 5.506.337), sulfamidas (patente de Estados Unidos 5.618.825), y benzodiazepinas (patente de Estados Unidos 5.288.514).

[0245] La exploración de moléculas similares a las moléculas de ARNip desveladas para la inhibición de la supresión con PAX2 de la expresión de DEFB1 es un procedimiento de aislamiento de los compuestos deseados.

60 **[0246]** Las moléculas aisladas pueden ser inhibidores competitivos o inhibidores no competitivos.

[0247] En otra realización, los inhibidores son inhibidores no competitivos. Un tipo de inhibidor no competitivo causará redispersiones alostéricas.

[0248] Como se usa en la presente memoria, los procedimientos combinatorios y bibliotecas incluyen procedimientos de exploración y bibliotecas tradicionales así como procedimientos y bibliotecas usados en procedimientos iterativos.

5 11. Diseño de fármacos asistido por ordenador

[0249] Las composiciones desveladas se pueden usar como dianas para cualquier técnica de modelado molecular para identificar la estructura de las composiciones desveladas o para identificar moléculas potenciales o reales, tales como moléculas pequeñas, que interaccionan de una forma deseada con las composiciones desveladas. Los ácidos nucleicos, péptidos y moléculas relacionadas desveladas en la presente memoria se pueden usar como dianas en cualquier programa o estrategia de modelado molecular.

[0250] Se entiende que cuando se usan las composiciones desveladas en técnicas de modelado se identificarán moléculas, tales como moléculas macromoleculares, que tienen propiedades deseadas particulares tales como inhibición o estimulación de la función de la molécula diana. Las moléculas identificadas y aisladas cuando se usan las composiciones desveladas, tales como la SEC ID Nº: 1, también están desveladas. Así, los productos producidos usando las estrategias de modelado molecular que implican las composiciones desveladas tales como la SEC ID Nº: 1, también se consideran desveladas en la presente memoria.

20 **[0251]** Así, un modo de aislar moléculas que se unen a una molécula de elección es mediante diseño racional. Esto se consigue mediante información estructural y modelado informático. La tecnología de modelado informático permite la visualización de la estructura atómica tridimensional de una molécula seleccionada y el diseño racional de nuevos compuestos que interaccionarán con la molécula. La construcción tridimensional depende típicamente de los datos de análisis cristalográficos de rayos x o formación de imágenes con RMN de la molécula seleccionada. La 25 dinámica molecular requiere datos de campo de fuerza. Los sistemas de gráficos informáticos permiten la predicción de cómo un nuevo compuesto se unirá con la molécula diana y permiten la manipulación experimental de las estructuras del compuesto y la molécula diana para perfeccionar la especificidad de unión. La predicción de cómo será la interacción de molécula-compuesto cuando se realizan pequeños cambios en uno o ambos requiere software de mecánica molecular y ordenadores informáticamente intensos, habitualmente acoplados con interfaces cómodas 30 para el usuario, dirigidas por menú entre el programa de diseño molecular y el usuario.

[0252] Son ejemplos de los sistemas de modelado molecular los programas CHARMM y QUANTA, Polymen Corporation, Waltham, MA. CHARMM realiza las funciones de minimización de energía y dinámica molecular. QUANTA realiza la construcción, modelado gráfico y análisis de la estructura molecular. QUANTA permite la 35 construcción interactiva, modificación, visualización y análisis del comportamiento de las moléculas entre sí.

[0253] Varios artículos revisan el modelado por ordenador de fármacos que interaccionan con proteínas específicas, tales como Rotivinen, *et al.*, 1988 Acta Pharmaceutica Fennica 97, 159-166; Ripka, New Scientist 54-57 (16 de junio de 1988); McKinlay y Rossmann, 1989 Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29, 111-122; Perry y Davies, QSAR: 40 Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design págs. 189-193 (Alan R. Liss, Inc. 1989); Lewis y Dean, 1989 Proc. R. Soc. Lond. 236, 125-140 y 141-162; y con respecto a una enzima de modelo para componentes de ácido nucleico, Askew, *et al.*, 1989 J. Am. Chem Soc. 111, 1082-1090. Otros programas informáticos que exploran e ilustran gráficamente productos químicos están disponibles en empresas tales como BioDesign, Inc., Pasadena, CA., Allelix, Inc., Mississauga, Ontario, Canadá e Hypercube, Inc., Cambridge, Ontario. Aunque los mismos están 45 diseñados principalmente para la aplicación a fármacos específicos para proteínas particulares, se pueden adaptar para el diseño de moléculas que interaccionan específicamente con regiones específicas de ADN o ARN, una vez que se haya identificado esa región.

[0254] Aunque se ha descrito anteriormente con referencia al diseño y la generación de compuestos que podrían 50 alterar la unión, se podrían explorar también bibliotecas de compuestos conocidos, que incluyen productos naturales o productos químicos sintéticos y materiales biológicamente activos que incluyen proteínas para compuestos que alteran la unión a sustrato o la actividad enzimática.

12. Medios legibles por ordenador

55 **[0255]** Se entiende que los ácidos nucleicos y las proteínas desvelados se pueden representar como una secuencia que consiste en los nucleótidos de aminoácidos. Existen diversos modos de presentar estas secuencias, por ejemplo, el nucleótido guanosina se puede representar mediante G o g. Asimismo, el aminoácido valina se puede representar mediante Val o V. Los expertos en la materia entienden cómo presentar y expresar cualquier secuencia 60 de ácido nucleico o de proteína en cualquiera de la diversidad de modos que existen, cada uno de los cuales se considera desvelado en la presente memoria. En la presente memoria está contemplada específicamente la presentación de estas secuencias en medios legibles por ordenador, tales como disquetes, cintas, chips, discos duros, discos compactos y discos de vídeo u otros medios legibles por ordenador disponibles en el mercado. También están desveladas las representaciones de código binario de las secuencias desveladas. Los expertos en la

materia entenderán los medios legibles por ordenador. Así, medios legibles por ordenador en los que se graban, almacenan o guardan las secuencias de ácido nucleico o de proteína.

[0256] Están desvelados medios legibles por ordenador que comprenden las secuencias e información con respecto a las secuencias expuestas en la presente memoria. También están desvelados medios legibles por ordenador que comprenden las secuencias e información con respecto a las secuencias expuestas.

C. Procedimientos

10 1. Administración

[0257] Una composición desvelada en la presente memoria se puede administrar de varios modos dependiendo de si se desea el tratamiento local o sistémico y del área a tratar. Por ejemplo, las composiciones se pueden administrar por vía oral, por vía parenteral (por ejemplo, inyección intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular), mediante inhalación, por vía extracorporeal, por vía tópica (incluyendo por vía transdérmica, por vía oftálmica, por vía vaginal, por vía rectal y por vía intranasal) o similares.

[0258] Como se usa en la presente memoria, "administración intranasal tópica" significa suministrar las composiciones a la nariz y las fosas nasales a través de uno o ambos orificios nasales y puede comprender el suministro mediante un mecanismo de pulverización o mecanismo de gotas o a través de aerosolización del ácido nucleico o vector. La administración de las composiciones mediante inhalador puede ser a través de la nariz o boca mediante suministro mediante un mecanismo de pulverización o gotas. El suministro puede ser también directamente a cualquier área del sistema respiratorio (por ejemplo, pulmones) mediante intubación.

25 [0259] La administración parenteral de la composición, si se usa, está caracterizada generalmente por inyección. Se pueden preparar inyectables en formas convencionales, como soluciones o suspensiones líquidas, formas sólidas adecuadas para solución de suspensión en líquido antes de la inyección o como emulsiones. Una estrategia revisada más recientemente para la administración parenteral implica el uso de un sistema de liberación lenta o liberación sostenida tal que se mantenga una dosificación constante. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 3.610.795 que se incorpora en la presente memoria como referencia.

[0260] La cantidad exacta de las composiciones requeridas variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la especie, edad, peso y estado general del sujeto, la gravedad del trastorno alérgico que se está tratando, del ácido nucleico o vector particular usado, su modo de administración y similares. Así, no es posible especificar una cantidad exacta para cada composición. Sin embargo, se puede determinar una cantidad apropiada por un experto habitual en la materia usando solamente experimentación rutinaria dadas las enseñanzas de la presente memoria. Así, se pueden determinar empíricamente dosificaciones eficaces y programas para la administración de las composiciones y la realización de tales determinaciones pertenece al conocimiento de la técnica. Los intervalos de dosificación para la administración de las composiciones son los que son suficientemente grandes para producir el efecto deseado en el 40 que están afectados los trastornos de síntomas. La dosificación no debe ser tan grande que cause efectos secundarios adversos, tales como reacciones cruzadas indeseadas, reacciones anafilácticas y similares. Generalmente, la dosificación varía con la edad, estado, sexo y alcance de la enfermedad en el paciente, vía de administración o si están incluidos otros fármacos en el régimen y se puede determinar mediante el experto en la materia. La dosificación se puede ajustar mediante el médico individual en el caso de cualquier contraindicación. La 45 dosificación puede variar y puede administrarse en una o más administraciones de dosis diarias, durante uno o varios días. Se puede encontrar una guía en la bibliografía para dosificaciones apropiadas para clases dadas de productos farmacéuticos.

[0261] Por ejemplo, una dosificación diaria típica de la composición desvelada usada en solitario puede variar de 50 aproximadamente 1 µg/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal o más por día dependiendo de los factores que se han mencionado anteriormente.

[0262] Despues de la administración de una composición desvelada para tratar, inhibir o prevenir el cáncer de próstata o PIN, la eficacia del producto terapéutico se puede evaluar de varias maneras bien conocidas por el facultativo experto. Por ejemplo, el experto habitual en la materia entenderá que una composición desvelada en la presente memoria es eficaz al tratar o inhibir cáncer de próstata en un sujeto observando que la composición reduce el antígeno PSA o evita un aumento adicional en el tamaño del tumor de próstata. El antígeno de PSA se puede medir mediante procedimientos que se conocen en la técnica, por ejemplo, usando ensayos de anticuerpos para detectar la presencia de proteína de PSA en una muestra (por ejemplo, pero sin limitación, sangre) de un sujeto o 60 paciente o midiendo el nivel de PSA circulante en el paciente.

[0263] Las composiciones que inhiben las interacciones desveladas en la presente memoria se pueden administrar profilácticamente a pacientes o sujetos que están en riesgo de cáncer de próstata o que se han diagnosticado recientemente de PIN o cáncer de próstata.

[0264] Otras moléculas que interaccionan con PSA o DEFB1 para inhibir las interacciones que no tienen una función farmacéutica específica pero que se pueden usar para rastrear los cambios dentro de cromosomas celulares o para el suministro de herramientas de diagnóstico por ejemplo se pueden suministrar de formas similares a las que se han descrito para los productos farmacéuticos.

5

2. Preparación

[0265] Las composiciones desveladas en la presente memoria y las composiciones necesarias para realizar los procedimientos desvelados se pueden preparar usando cualquier procedimiento conocido por los expertos en la 10 materia para ese reactivo o compuesto particular a menos que se indique específicamente de otro modo.

i. Síntesis de ácido nucleico

[0266] Por ejemplo, los ácidos nucleicos tales como los oligonucleótidos a usar como cebadores se pueden preparar 15 usando procedimientos de síntesis química convencionales o se pueden producir usando procedimientos enzimáticos o cualquier otro procedimiento conocido. Tales procedimientos pueden variar de una digestión enzimática convencional seguida de aislamiento de fragmentos de nucleótidos (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2^a Edición (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) capítulos 5, 6) a procedimientos puramente sintéticos, por ejemplo, mediante el procedimiento de cianoetil 20 fosforamidita usando un sistema Milligen o Beckman 1Plus DNA synthesizer (por ejemplo, sintetizador automatizado modelo 8700 de Milligen-Bioscience, Burlington, MA o modelo ABI 380B). También están descritos procedimientos sintéticos útiles para preparar oligonucleótidos por Ikuta *et al.*, Ann. Rev. Biochem. 53:323-356 (1984), (procedimientos de fosfotriéster y fosfito-triéster) y Narang *et al.*, Methods Enzymol., 65:610-620 (1980), (procedimiento de fosfotriéster). Se pueden preparar moléculas de ácido nucleico de proteínas usando 25 procedimientos conocidos tales como los descritos por Nielsen *et al.*, Bioconjug. Chem. 5:3-7 (1994).

II. Síntesis de péptidos

[0267] Un procedimiento de producción de las proteínas desveladas, tales como la SEC ID Nº: 23, es unir dos o más 30 péptidos o polipéptidos entre sí mediante técnicas de química de proteínas. Por ejemplo, los péptidos o polipéptidos se pueden sintetizar químicamente usando equipamiento de laboratorio disponible actualmente usando química de Fmoc (9-fluorenilmetiloxicarbonilo) o Boc (terc-butiloxicarbonilo). (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). El experto en la materia puede entender de forma sencilla que se puede sintetizar un péptido o polipéptido correspondiente a las proteínas desveladas, por ejemplo, mediante reacciones químicas convencionales. Por 35 ejemplo, un péptido o polipéptido se puede sintetizar y no escindirse de su resina de síntesis mientras que el otro fragmento de un péptido o proteína se puede sintetizar y escindirse posteriormente de la resina, exponiendo de este modo un grupo terminal que está bloqueado funcionalmente en el otro fragmento. Mediante reacciones de condensación de péptidos, estos dos fragmentos se pueden unir covalentemente mediante un enlace peptídico en sus extremos carboxilo y amino, respectivamente, para formar un anticuerpo o fragmentan del mismo. (Grant GA 40 (1992) Synthetic Peptides: A User Guide. W.H. Freeman and Co., N.Y. (1992); Bodansky M y Trost B., Ed. (1993) Principles of Peptide Synthesis. Springer-Verlag Inc., NY (que se incorpora en la presente memoria como referencia al menos para el material relacionado con la síntesis de péptidos). Como alternativa, el péptido o polipéptido se sintetiza independientemente *in vivo* como se describe en la presente memoria. Una vez aislados, estos péptidos o polipéptidos independientes pueden unirse para formar un péptido o fragmento del mismo mediante reacciones de 45 condensación de péptidos similares.

[0268] Por ejemplo, la ligación enzimática de segmentos peptídicos clonados o sintéticos permite que fragmentos peptídicos relativamente cortos se unan para producir fragmentos peptídicos de mayor tamaño, polipéptidos o dominios proteicos completos (Abrahmsen L *et al.*, Biochemistry, 30:4151 (1991)). Como alternativa, la ligación 50 química nativa de péptidos sintéticos se puede utilizar para construir sintéticamente grandes péptidos o polipéptidos a partir de fragmentos peptídicos más cortos. Este procedimiento consiste en una reacción química de dos etapas (Dawson *et al.* Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. Science 266:776-779 (1994)). La primera etapa es la reacción quimioselectiva de un péptido-tioéster sintético desprotegido con otro segmento peptídico desprotegido que contiene un resto Cys amino terminal para dar un intermedio ligado a tioéster como el producto covalente inicial. 55 Sin un cambio en las condiciones de reacción, este intermedio se somete a reacción espontánea intramolecular rápida para formar un enlace peptídico nativo en el sitio de ligación (Baggiolini M *et al.* (1992) FEBS Lett. 307:97-101; Clark-Lewis I *et al.*, J.Biol.Chem., 269:16075 (1994); Clark-Lewis I *et al.*, Biochemistry, 30:3128 (1991); Rajarathnam K *et al.*, Biochemistry 33:6623-30 (1994)).

60 **[0269]** Como alternativa, los segmentos peptídicos desprotegidos se une químicamente donde el enlace formado entre los segmentos peptídicos como resultado de la ligación química es un enlace no natural (no peptídico) (Schnolzer, M *et al.* Science, 256:221 (1992)). Esta técnica se ha usado para sintetizar análogos de dominios proteicos así como grandes cantidades de proteínas relativamente puras con actividad biológica completa (deLisle Milton RC *et al.*, Techniques in Protein Chemistry IV. Academia Press, Nueva York, págs. 257-267 (1992)).

65

D. Definiciones

- [0270] A menos que se indique de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen los mismos significados como lo que se entiende comúnmente por el experto en la materia a la que pertenecen el procedimiento y las composiciones desveladas. Aunque se pueden usar cualquier procedimiento y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo del presente procedimiento y las composiciones, los procedimientos, dispositivos y materiales particularmente útiles son como se describe. Las publicaciones citadas en la presente memoria y el material para el que se citan se incorporan de este modo específicamente como referencia. Nada en la presente memoria se tiene que considerar una admisión de que la presente invención no tiene derecho a ser anterior a tal divulgación mediante la invención anterior. No se realiza admisión de que ninguna referencia constituya técnica anterior. La discusión de referencias indica lo que afirman sus autores y los solicitantes se reservan el derecho de poner en duda la precisión y pertinencia de los documentos citados.
- [0271] Se tiene que señalar que como se usa en la presente memoria y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "la" y "el" incluyen la referencia plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Así, por ejemplo, la referencia a "un péptido" incluye una pluralidad de tales péptidos, la referencia a "el péptido" es una referencia a uno o más péptidos y equivalentes del mismo conocidos por el experto en la materia, etc.
- [0272] "Opcional" u "opcionalmente" quiere decir que el acontecimiento, circunstancia o material descrito posteriormente puede o no ocurrir o estar presente y que la descripción incluye casos en los que el acontecimiento, circunstancia o material ocurre o está presente y casos en los que no ocurre o no está presente.
- [0273] Los intervalos se pueden expresar en la presente memoria como de "aproximadamente" un valor particular y/o hasta "aproximadamente" otro valor particular. Cuando se expresa tal intervalo, otra realización incluye de un valor particular y/o al otro valor particular. De modo similar, cuando se expresan valores como aproximaciones, mediante el uso del antecedente "aproximadamente", se entenderá que el valor particular forma otra realización. Se entenderá además que los puntos finales de cada uno de los intervalos son significativos en relación con el otro punto final e independientemente del otro punto final. Se entiende también que existen varios valores desvelados en la presente memoria y que cada valor se desvela en la presente memoria también como "aproximadamente" ese valor particular además del propio valor. Por ejemplo, si se desvela el valor "10", entonces "aproximadamente 10" también está desvelado. Se entiende también que cuando se desvela un valor que es "menor de o igual al" el valor, "mayor de o igual al valor" y posibles intervalos entre los valores también están desvelados como se entiende de forma apropiada por el experto. Por ejemplo, si el valor "10" se desvela también se desvela el "menor de o igual a 10" así como "mayor de o igual a 10". Se entiende también que a lo largo de la solicitud se proporcionan datos en varios formatos diferentes, y que estos datos representan puntos finales y puntos de partida e intervalos para cualquier combinación de los puntos de datos. Por ejemplo, si un punto de dato "10" particular y un punto de dato 15 particular se desvela, se entiende que mayor de, mayor de o igual a, menor de, menor de o igual a e igual a 10 y 15 se consideran asimismo desvelados al igual que entre 10 y 15. Se entiende también que cualquier unidad entre dos unidades particulares también está desvelada. Por ejemplo, si se desvelan 10 y 15, entonces también se desvelan 11, 12, 13 y 14.
- [0274] A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, la palabra "comprende" y variaciones de la palabra, tales como "que comprende" y "comprende" significa "incluye pero sin limitación" y no tiene por objeto excluir, por ejemplo, otros aditivos, componentes, integrantes o etapas.

- [0275] A lo largo de esta solicitud, se hace referencia a diversas publicaciones. Las divulgaciones de estas publicaciones en su totalidad se incorporan de este modo como referencia en la presente solicitud para describir más completamente el estado de la técnica a la que esto pertenece. Las referencias desveladas están incorporadas también individual y específicamente como referencia a la presente memoria para el material contenido en las mismas que se analiza la frase en la que se basa la referencia.

E. Ejemplos

- 1. Ejemplo 1: La Defensina beta humana 1 es citotóxica para cáncer de próstata de estadio tardío y desempeña un papel en la inmunidad tumoral de cáncer de próstata**

Resumen

- [0276] Se clonó DEFB1 en un sistema de expresión inducible para examinar qué efecto tenía sobre células epiteliales de próstata normales, así como líneas celulares de cáncer de próstata positivas a receptor de andrógenos (AR⁺) y negativas a receptor de andrógenos (AR⁻). La inducción de la expresión de DEFB1 dio como resultado una disminución del crecimiento celular en células AR⁺ DU145 y PC3 pero no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de las células de cáncer de próstata AR⁺ LNCaP. DEFB1 también causó la inducción rápida de apoptosis mediada por

caspasa. Los datos presentados en este caso son los primeros en proporcionar pruebas de su papel en la inmunidad tumoral innata e indica que su pérdida contribuye a la progresión tumoral en cáncer de próstata.

Materiales y procedimientos

5

[0277] Líneas celulares: Las líneas celulares DU145 se cultivaron en medio DMEM, PC3 se cultivaron en medio F12 y LNCaP se cultivaron en medio RPMI (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY). El medio de cultivo para las tres líneas se complementó con suero fetal bovino a 10% (v/v) (Life Technologies). Las células hPrEC se cultivaron en medio basal de epitelio de próstata (Cambrex Bio Science, Inc., Walkersville, MD). Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37 °C y CO₂ a 5%.

[0278] Muestras tisulares y microdissección con captura de láser: los tejidos de próstata obtenidos de pacientes con consentimiento que se sometieron a prostatectomía radical se adquirieron a través del banco de tumor del centro de cáncer Hollings de acuerdo con un protocolo aprobado por la comisión de revisión institucional. Esto incluía directrices para el procesamiento, sección, caracterización histológica, purificación de ARN y amplificación por PCR de muestras. Después del examen patológico de secciones titulares congeladas, se realizó microdissección de captura de láser (LCM) para garantizar que las muestras titulares ensayadas consistían en poblaciones puras de células de próstata benignas. Para cada sección tisular analizada se realizó LCM en tres regiones diferentes que contenían tejido benigno y las células recogidas después se agruparon.

20

[0279] Clonación del gen DEFB1: Se generó ADNc de DEFB 1 a partir de ARN mediante PCR de transcripción inversa. Los cebadores de PCR se diseñaron para contener sitios de restricción *Clal* y *KpnI*. Los productos de PCR DEFB1 se digirieron por restricción con *Clal* y *KpnI* y se ligaron en un vector de clonación de TA. El vector TA/DEFB1 se introdujo después mediante transfección en *E. coli* mediante choque térmico y se seleccionaron y expandieron clones individuales. Se aislaron los plásmidos mediante Midiprep de ADN de cultivo celular (Qiagen, Valencia, CA) y se verificó la integridad de secuencia mediante secuenciación automatizada. El fragmento génico de DEFB1 se ligó después en el pTRE2 digerido con *Clal* y *KpnI*, que sirvió como un vector intermedio para fines de orientación. Después, la construcción pTRE2/DEFB1 se dirigió con *Apal* y *KpnI* para escindir el inserto de DEFB1, que se ligó en el vector pIND del sistema de expresión inducible con Ecdisona (Invitrogen, Carlsbad, CA) también se dirigió dos veces con *Apal* y *KpnI*. La construcción se introdujo de nuevo mediante transfección en *E. coli* y se seleccionaron y expandieron clones individuales. Se aislaron los plásmidos y se verificó de nuevo la integridad de secuencia de pIND/DEFB1 mediante secuenciación automatizada.

[0280] Transfección: Se sembraron células (1×10^6) en placas de Petri de 100 mm y se dejaron crecer durante una noche. Después, las células se introdujeron mediante co-transfección usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) con 1 µg de plásmido pVgRXR, que expresa el receptor de ecdisona heterodimérico y 1 µg de la construcción de vector pIND/DEFB1 o vector de control pIND vacío en medio Opti-MEM (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY).

40 **[0281] Aislamiento de ARN y RT-PCR cuantitativa:** Para verificar la expresión de proteína de DEFB 1 en las células transfectadas con la construcción de DEFB1, se recogió ARN después de un período de inducción de 24 horas con Ponasterona A (Pon A). En resumen, el ARN total se aisló usando el sistema de aislamiento de ARN total SV (Promega, Madison, WI) de aproximadamente 1×10^6 células recogidas mediante tripsinización. En este caso, las células se lisaron y se aisló el ARN total mediante centrifugación mediante columnas de centrifugación. Para las 45 células recogidas mediante LCM, se aisló el ARN total usando el kit de aislamiento de ARN PicoPure (Arcturus Biosciences, MT. View, CA) siguiendo el protocolo del fabricante. El ARN total (0,5 µg por reacción) de ambas fuentes se transcribió de forma inversa en ADNc usando cebadores aleatorios (Promega). Se usó la enzima de transcriptasa inversa de AMV II (500 unidades por reacción; Promega) para la síntesis de la primera cadena y la ADN polimerasa de Tfl para la síntesis de la segunda cadena (500 unidades por reacción; Promega) como por el 50 protocolo del fabricante. En cada caso, se usaron 50 pg de ADNc para garantizar la reacción de PCR. Se realizó QRT-PCR de dos etapas en ADNc generado usando la transcriptasa inversa MultiScribe del sistema de transcripción inversa TaqMan y la mezcla madre de PCR SYBR Green (Applied Biosystems).

55 **[0282]** El primer par para DEFB1 (Tabla 2) se generó a partir de la secuencia de DEFB1 publicada (Nº de acceso de GenBank U50930). Se realizaron cuarenta ciclos de PCR en condiciones convencionales usando una temperatura de hibridación de 56 °C. Además se amplificó β-actina (Tabla 2) como un gen constitutivo para normalizar el contenido inicial del ADNc total. Se calculó la expresión de DEFB1 como la proporción de expresión relativa entre DEFB1 y β-actina y se comparó en las líneas celulares inducidas y no inducidas para la expresión de DEFB1 así como tejido prostático benigno de LCM. Como un control negativo se realizaron también reacciones de QRT-PCR 60 sin molde de ADNc. Todas las reacciones se procesaron tres veces por triplicado.

[0283] Ensayo de viabilidad de células de MTT: Para examinar los efectos de DEFB1 sobre el crecimiento celular, se realizaron ensayos metabólicos con bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio (MTT). Se sembraron células PC3, DU145 y LNCaP introducidas mediante co-transfección con el plásmido pVgRXR y la construcción pIND/DEFB1 o vector pIND vacío en una placa de 96 pocillos con $1-5 \times 10^3$ células por pocillo. Veinticuatro horas

después del sembrado se añadió medio de cultivo fresco que contenía Ponasterona A 10 µM diariamente para inducir la expresión de DEFB1 durante 24, 48 y 72 horas después de lo cual se realizó el ensayo de MTT de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega). Las reacciones se realizaron tres veces por triplicado.

- 5 [0284] *Citometría de flujo:* Las células PC3 y DU145 introducidas mediante co-transfección con el sistema de expresión de DEFB1 se cultivaron en placas de 60 mm y se indujeron durante 12, 24 y 48 horas con Ponasterona A 10 µM. Después de cada período de incubación, el medio se recogió de las placas (para retener cualquier célula desprendida) y se combinó con PBS usado para lavar las placas. Las células unidas restantes se recogieron mediante trispirinización y se combinaron con las células desprendidas y PBS. Después, las células se sedimentaron 10 a 4 °C (500 x g) durante 5 min, se lavaron dos veces en PBS y se resuspendieron en 100u de 1 x tampón de unión de Anexina (Hepes 0,1 M/NaOH a pH 7,4, NaCl 1,4 M, CaCl₂ 25 mM) que contenía 5 µl de Anexina V-FITC y 5 µ de PI. Las células se incubaron a TA durante 15 min en oscuridad, después se diluyeron con 400 µl de tampón de unión de Anexina 1x y se analizaron por FACscan (Becton Dickinson, San José, CA). Todas las reacciones se realizaron tres veces.
- 15 [0285] *Análisis microscópico:* Se analizó la morfología celular mediante microscopía de contraste de fases. Se sembraron células DU145, PC3 y LNCaP que no contenían vector, plásmido vacío o plásmido de DEFB1 en placas de cultivo de 6 pocillos (BD Falcon, Estados Unidos). El siguiente día se indujeron las células que contenían plásmido durante un período de 48 horas con medio que contenía Ponasterona A 10 µM, mientras que las células de 20 control recibieron medio fresco. Después, las células se visualizaron bajo un microscopio invertido de Zeiss IM 35 (Carl Zeiss, Alemania). Se obtuvieron imágenes de contraste de fase de un campo de células usando la cámara SPOT Insight Mosaic 4.2 (Diagnostic Instruments, Estados Unidos). Las células se examinaron mediante microscopía de contraste de fases con un aumento de 32X y se almacenaron las imágenes digitales como archivos TIFF no comprimidos y se exportaron a software Photoshop CS (Adobe Systems, San Jose, CA) para el 25 procesamiento de imagen y presentación en copia impresa.

Detección de Caspasa

- [0286] La detección de la actividad de caspasa en las líneas celulares de cáncer de próstata se realizó usando el kit 30 de detección de caspasa de carboxifluoresceína APO LOGIX™ (Cell Technology, Mountain View, CA). Las caspasas activas se detectaron mediante el uso de un inhibidor de FAM-VAD-FMK que se une irreversiblemente a caspasas activas. En resumen, las células DU145 y PC3 (1,5-3 X 10⁵) que contenían el sistema de expresión de DEFB1 se sembraron en micropocillos de fondo de vidrio de 35 mm (Matek, Ashland, MA) y se trajeron durante 24 horas con medio solamente o con medio que contenía PonA como se ha descrito previamente. A continuación, 10 µl 35 de una dilución de trabajo 30X de fluorometilcetona de péptido marcada con carboxifluoresceína (FAM-VAD-FMK) se añadió a 300 µl de medio y se añadió a cada placa de 35 mm. Después, las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C en CO₂ a 5%. Después, el medio se aspiró y las células se lavaron dos veces con 2 ml de un tampón de lavado de dilución de trabajo 1X. Las células se visualizaron bajo contraste de interferencia diferencial (DIC) o con excitación con láser a 488 nm. La señal fluorescente se analizó usando un microscopio confocal (Zeiss LSM 5 40 Pascal) y una lente de aceite DIC 63X con un módulo de exploración con láser Vario 2 RGB.

Análisis estadístico

- [0287] Las diferencias estadísticas se evaluaron usando el ensayo t de Student para valores no emparejados. Se 45 determinaron los valores de P mediante un cálculo de dos lados y se consideró estadísticamente significativo un valor P de menos de 0,05.

Resultados

- 50 [0288] *Expresión de DEFB1 en tejido y líneas celulares de próstata:* Se midieron los niveles de expresión de DEFB1 mediante QRT-PCR en tejido prostático benigno y maligno, células epiteliales de próstata hPrEC y células de cáncer de próstata DU145, PC3 y LNCaP. Se detectó expresión de DEFB1 en todas las muestras clínicas benignas. La cantidad promedio de expresión relativa de DEFB1 fue 0,0073. Además, la expresión relativa de DEFB1 en células hPrEC fue 0,0089. No había diferencia estadística en la expresión de DEFB1 detectada en las muestras tisulares 55 prostáticas benignas y hPrEC (Figura 1A). El análisis de los niveles de expresión relativa de DEFB1 en las líneas celulares de cáncer de próstata mostró niveles significativamente menores en DU145, PC3 y LNCaP. Como un punto de referencia adicional, se midió la expresión relativa de DEFB1 en la sección maligna adyacente de tejido prostático del paciente N° 1215. No había ninguna diferencia significativa en el nivel de la expresión de DEFB1 observada en las tres líneas de cáncer de próstata en comparación con el tejido prostático maligno del paciente N° 60 1215 (Figura 1B). Además, los niveles de expresión en las cuatro muestras fueron próximos a los controles negativos sin molde que confirmaron de poca a ninguna expresión endógena de DEFB1 (datos no mostrados). También se realizó QRT-PCR en las líneas celulares de cáncer de próstata transfectadas con el sistema de expresión de DEFB1. Después de un período de inducción de 24 horas, los niveles de expresión relativa fueron 65 0,01360 en DU145, 0,01503 en PC3 y 0,138 en LNCaP. Los productos de amplificación se verificaron mediante electroforesis en gel.

[0289] Se realizó QRT-PCR en regiones titulares de LCM que contenían benigno, PIN y cáncer. La expresión relativa de DEFB1 fue 0,0146 en la región benigna en comparación con 0,0009 en la región maligna (Figura 1C). Esto representa una disminución de 94% que demuestra de nuevo una regulación negativa significativa de la expresión. Además, el análisis de PIN mostró que el nivel de expresión de DEFB1 era 0,044 que era una disminución de 70%. Comparando la expresión en el paciente Nº 1457 con el nivel de expresión promedio encontrado en las regiones benignas de seis otros pacientes (Figura 1A) mostró una proporción de 1,997 que representa prácticamente dos veces la expresión (Figura 1D). Sin embargo, la proporción de expresión fue 0,0595 en PIN y fue 0,125 en tejido maligno en comparación con los niveles de expresión promedio en tejido benigno.

10

[0290] *DEFB1 causa permeabilidad y ondulamiento de membrana celular:* La inducción de DEFB1 en las líneas celulares de cáncer de próstata dio como resultado una reducción significativa en el número de células en DU145 y PC3, pero no tuvo ningún efecto sobre la proliferación celular en LNCaP (Figura 2). Como un control negativo se controló la proliferación celular en las tres líneas que contenían plásmido vacío. No había ningún cambio observable en la morfología celular en las células DU145, PC3 o LNCaP después de la adición de PonA. Además, la inducción de DEFB1 dio como resultado cambios morfológicos tanto en DU145 como en PC3. En este caso, las células parecían más redondeadas y mostraban ondulación de la membrana indicativa de muerte celular. También estaban presentes cuerpos apoptóticos en ambas líneas.

15

[0291] *La expresión de DEFB1 da como resultado viabilidad celular disminuida:* El ensayo de MTT mostró una reducción en la viabilidad celular por DEFB1 en células PC3 y DU145, pero ningún efecto significativo en células LNCaP (Figura 3). Después de 24 horas, la viabilidad celular relativa fue de 72% en DU145 y de 56% en PC3. El análisis 48 horas después de la inducción mostró una viabilidad celular de 49% en DU145 y una viabilidad celular de 37% en PC3. Después de 72 horas de expresión de DEFB1 dio como resultado una viabilidad celular relativa de 25 44% y 29% en las células DU145 y PC3, respectivamente.

20

[0292] *DEFB1 causa apoptosis mediada por caspasa rápida en células de cáncer de próstata de estadio tardío:* Para determinar si los efectos de DEFB1 sobre PC3 y DU145 eran citostáticos o citotóxicos se realizó el análisis FACS. En condiciones de crecimiento normales, más de 90% de los cultivos de PC3 y de DU145 eran viables y no 30 apoptóticos (cuadrante izquierdo inferior) y no se tiñeron con anexina V o PI (Figura 4). Después de inducir la expresión de DEFB1 en células PC3, el número de células apoptóticas (cuadrantes derecho inferior y superior) ascendieron a 10% a las 12 horas, 20% a las 24 horas y 44% a las 48 horas. Para las células DU145, el número de células apoptóticas ascendió a 12% después de 12 horas, 34% a las 24 horas y 59% después de 48 horas de inducción. No hubo ningún aumento en la apoptosis observada en células que contenían plásmido vacío después de 35 la inducción con PonA (datos no mostrados).

35

[0293] Se determinó la actividad de caspasa mediante análisis microscópico con láser confocal (Figura 5). Las células DU145 y PC3 se indujeron para la expresión de DEFB1 y se controló la actividad basándose en la unión de FAM-VAD-FMK fluorescente verde a caspasas en células que se estaban sometiendo activamente a apoptosis. El 40 análisis de células bajo DIC mostró la presencia de células DU145 (A), PC3 (E) y LNCaP (I) de control viables a las 0 horas. La excitación con el láser confocal a 488 nm no produjo tinción verde detectable lo que indica ninguna actividad de caspasa en DU145 (B), PC3 (F) o LNCaP (J). Después de la inducción durante 24 horas, las células DU145 (C), PC3 (G) y LNCaP (K) eran de nuevo visibles bajo DIC. El análisis confocal con fluorescencia mostró tinción verde en células DU145 (D) y PC3 (H) indicando actividad de caspasa. Sin embargo, no hubo ninguna tinción 45 verde en LNCaP (L), indicando que no había ninguna inducción de apoptosis por DEFB1.

Conclusión

50

[0294] Para ensayar su papel funcional, el gen de DEFB1 se clonó en el sistema de expresión inducible con ecdisona y su efecto sobre las células de cáncer de próstata se examinó. Los presentes datos demuestran la actividad citotóxica de DEFB1 contra células de cáncer de próstata resistentes a hormonas negativas a receptor de andrógenos de estadio tardío. En conclusión, este estudio proporciona el papel funcional de DEFB1 en cáncer de próstata. Además, estos hallazgos muestran que DEFB1 es parte de un sistema inmune innato implicado en la 55 inmunidad tumoral. Los datos presentados en este caso demuestran que DEFB1 expresado a niveles fisiológicos es citotóxico para células de cáncer de próstata resistentes a hormonas AR⁻, pero no para células de cáncer de próstata sensibles a hormonas AR⁺ ni para células epiteliales de próstata normales. Dado que DEFB1 se expresa constitutivamente en células de próstata normales sin citotoxicidad, puede ser que las células de cáncer de próstata AR⁻ de estadio tardío posean distintas características fenotípicas que hace que las mismas sean sensibles a citotoxicidad de DEFB1. Así, DEFB1 es un agente terapéutico viable para el tratamiento de cáncer de próstata de 60 estadio tardío.

2. Ejemplo 2: La anulación mediada por ARNip de la expresión de PAX2 da como resultado muerte celular de cáncer de próstata independiente del estado de p53

Resumen

5 [0295] Este ejemplo examina los efectos de la inhibición de la expresión de PAX2 mediante interferencia de ARN en células de cáncer de próstata que difieren el estado del gen p53. Estos resultados demuestran que la inhibición de PAX2 da como resultado muerte celular independientemente del estado de p53, indicando que existen genes supresores tumorales adicionales o rutas de muerte celular inhibidas por PAX2 en cáncer de próstata.

10 Materiales y procedimientos

[0296] *Líneas celulares:* Las líneas celulares PC3, DU145 y LNCaP se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Rockville, MD, Estados Unidos). Se cultivaron células PC3 en medio F-12, DU145 en DMEM y LNCaP en RPMI todos complementados con suero fetal bovino a 10% (v/v). Las células se mantuvieron a 37 °C en CO₂ a 5%.

[0297] *Silenciamiento de ARNip de PAX2:* Para conseguir el silenciamiento génico eficaz, se sintetizó un grupo de cuatro ribonucleótidos interferentes cortos (ARNip) complementarios dirigidos a ARNm de PAX2 humano (Nº de acceso NM_003989.1) (Dharmacon Research, Lafayette, CO, Estados Unidos). Se usó un segundo grupo para cuatro ARNip como un control interno para ensayar la especificidad de ARNip de PAX2. Dos de las secuencias sintetizadas se dirigen al ARNm de luciferasa GL2 (Nº de acceso X65324) y dos no eran específicas de secuencia (Tabla 3). Para la hibridación de ARNip se incubaron 35 M de cadenas sencillas en tampón de hibridación (acetato de potasio 100 mM, HEPES-KOH 30 mM a pH 7,4, acetato de magnesio 2 mM) durante 1 minuto a 90 °C seguido de 25 1 hora de incubación a 37 °C.

[0298] *Análisis de Western:* En resumen, las células se recogieron mediante tripsinización y se lavaron dos veces con PBS. El tampón de lisis se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Sigma) y después se añadió a las células. Después de un período de incubación de 15 minutos a 4 °C en un agitador orbital, después se recogió el lisado celular y se centrifugó durante 10 minutos a 12000xg para sedimentar los restos celulares. Después el sobrenadante que contenía proteínas se recogió y cuantificó. A continuación, 25 µg de extracto de proteínas se cargaron en un SDS-PAGE de gradiente 8-16% (Novex). Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF y después se bloquearon con leche en polvo desnatada a 5% en TTBS (Tween 20 a 0,05% y Tris-Cl 100 mM) durante 1 hora. Después, las transferencias se sondaron con anticuerpo primario de conejo anti-PAX2 (Zymed, San Francisco, CA) a una dilución 1:2000. Después del lavado, las membranas se incubaron con anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano rusticano (HRP) (dilución 1:5000; Sigma) y se visualizó la señal de detección usando reactivos de quimioluminiscencia (Pierce) en un Alpha Innotech Fluorchem 8900. Como un control, las transferencias se separaron y resondaron con un anticuerpo primario de ratón anti-β-actina (1:5000; Sigma-Aldrich) y anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con HRP (1:5000; Sigma-Aldrich) y se visualizó de nuevo la señal de detección.

[0299] *Microscopía de contraste de fase:* El efecto de la anulación de PAX2 en el crecimiento celular se analiza mediante microscopía de contraste de fases. En este caso se sembraron 1-2 x 10⁴ células en placas de cultivo de 6 pocillos (BD Falcon, Estados Unidos). Al día siguiente, las células se trataron solamente con medio, ARNip no específico de control negativo o ARNip de PAX2 y se dejaron incubar durante seis días. Después, las células se visualizaron bajo un microscopio invertido Zeiss IM 35 (Carl Zeiss, Alemania) con un aumento de 32X. Se obtuvieron imágenes de contraste de fase de un campo de células usando la cámara SPOT Insight Mosaic 4.2 (Diagnostic Instruments, Estados Unidos).

50 [0300] *Ensayo de citotoxicidad de MTT:* Se transfectaron células DU145, PC3 y LNCaP (1 x 10⁵) con 0,5 µg del grupo de ARNip de PAX2 o grupo de ARNip de control usando el reactivo de transfección de Codebreaker de acuerdo con el protocolo del fabricante (Promega). A continuación, las suspensiones celulares se diluyeron y sembraron en una placa de 96 pocillos con 1-5 x 10³ células por pocillo y se dejaron crecer durante 2, 4 ó 6 días. Después del cultivo se determinó la viabilidad celular midiendo la conversión de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-55 2,5 difenil tetrazolio, MTT (Promega) a un producto de formazán coloreado. La absorbancia se leyó a 540 nm en un espectrofotómetro multipocillo de exploración.

[0301] *Detección de Pan-caspasa:* La detección de la actividad de caspasa en líneas celulares de cáncer de próstata se realizó usando el kit de detección de caspasa de carboxifluoresceína APO LOGIX™ (Cell Technology, Mountain View, CA). Las caspasas activas se detectaron mediante el uso de un inhibidor de FAM-VAD-FMK que se une irreversiblemente a caspasas activas. En resumen, se sembraron células (1-2 X 10⁴) en placas de micropocillos de fondo de vidrio de 35 mm (Matek, Ashland, MA) y se trataron solamente con medio o ARNip de PAX2 como se ha descrito previamente. A continuación, se añadieron 10 µl de una dilución de trabajo 30X de fluorometil cetona de péptido marcada con carboxifluoresceína (FAM-VAD-FMK) a 300 µl de medio y se añadió a cada placa de 35 mm. 65 Después, las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C con CO₂ a 5%. Después, el medio se aspiró y las células

se lavaron dos veces con 2 ml de un tampón de lavado de dilución de trabajo 1X. Las células se visualizaron con contraste de interferencia diferencial (DIC) o con excitación con láser a 488 nm. La señal fluorescente se analizó usando un microscopio confocal (Zeiss LSM 5 Pascal) y una lente de aceite DIC 63X con un módulo de exploración con láser Vario 2 RGB.

5

[0302] RT-PCR en tiempo real cuantitativa: Se realizó RT-PCR en tiempo real cuantitativa para verificar la expresión génica después del tratamiento con ARNip de PAX2 en líneas celulares PC3, DU145 y LNCaP. El ARN total se aisló usando el sistema de aislamiento de ARN total SV (Promega). En resumen, aproximadamente 1×10^6 células se recogieron mediante trisnización y se enjuagaron en PBS. Después, las células se lisaron y se aisló el ARN total mediante centrifugación a través de columnas de centrifugación. El ARN total (0,5 µg por reacción) se sometió a transcripción inversa en ADNc utilizando el cebador Oligo (dT) 15 (Promega) y la enzima transcriptasa inversa AMV II (500 unidades por reacción; Promega) para la síntesis de la primera cadena y ADN polimerasa de Tfl para la síntesis de la segunda cadena (500 unidades por reacción; Promega) como por el protocolo del fabricante, con muestras de control idénticas tratadas sin enzima de RT. Típicamente, 50 pg de cada ADNc se usó para garantizar la reacción de PCR. Se realizó QRT-PCR de dos etapas en ADNc generado usando la transcriptasa inversa MultiScribe del sistema de transcripción inversa TaqMan y la mezcla madre de PCR SYBR Green (PE Biosystems). Los pares de cebador para BAX, BID y BAD se generaron a partir de las secuencias publicadas (Tabla 3). Se realizaron reacciones en la placa de reacción de 96 pocillos óptica MicroAmp (PE Biosystems). Se realizaron cuarenta ciclos de PCR en condiciones convencionales usando una temperatura de hibridación de 60 °C. La cuantificación se determinó mediante el número de ciclos en los cuales comenzó la amplificación exponencial (valor umbral) y se promedió a partir de los valores obtenidos de las repeticiones por triplicado. Había una relación inversa entre el nivel de mensaje y el valor umbral. Además, se usó GAPDH como un gen constitutivo para normalizar el contenido inicial del ADNc total. Se calculó la expresión génica como la proporción de expresión relativa entre los genes pro-apoptóticos y GAPDH. Todas las reacciones se realizaron por triplicado.

25

Resultados

[0303] Inhibición de ARNip de la proteína PAX2: Para confirmar que el ARNip se dirigió de forma eficaz al ARNm de PAX2, se realizó análisis de Western para controlar los niveles de expresión de la proteína PAX2 a lo largo de un período de tratamiento de seis días. Las células se pasaron por una única ronda de transfección con el grupo de ARNip de PAX2. Los resultados confirmaron el direccionamiento específico de ARNm de PAX2 mostrando la anulación de la proteína PAX2 el día cuatro en DU145 (Figura 6a) y el día seis en PC3 (Figura 6b).

[0304] La anulación de PAX2 inhibe el crecimiento de células de cáncer de próstata: Las células se analizaron después de un período de tratamiento de seis días solamente con medio, ARNip no específico de control negativo o ARNip de PAX2 (Figura 7). Las células DU145 (a), PC3 (d) y LNCaP (g) alcanzaron todas al menos 90% de confluencia en las placas de cultivo que contenían solamente medio. El tratamiento de DU145 (b), PC3 (e) LNCaP (h) con ARNip no específico de control negativo no tuvo efecto sobre el crecimiento celular y las células alcanzaron de nuevo la confluencia después de seis días. Sin embargo, el tratamiento con ARNip de PAX2 dio como resultado una disminución significativa en el número celular. Las células DU145 eran aproximadamente confluentes a 15% (c) y las células PC3 eran confluentes solamente a 10% (f). Las células LNCaP eran confluentes a 5% después del tratamiento con ARNip.

[0305] Ensayos de citotoxicidad: La viabilidad celular se midió después de tiempos de exposición de dos, cuatro y seis días y se expresa como una proporción de la absorbancia de 570-630 nm de células tratadas dividido por la de células de control no tratadas (Figura 8). La viabilidad celular relativa después de 2 días de tratamiento fue de 77% en LNCaP, 82% en DU145 y 78% en PC3. Después de cuatro días, la viabilidad celular relativa era de 46% en LNCaP, de 53% en DU145 y de 63% en PC3. Después de seis días de tratamiento, la viabilidad celular relativa disminuyó a 31% en LNCaP, a 37% en PC3 y fue de 53% en DU145. Como controles negativos, la viabilidad celular se midió después de un período de tratamiento de seis días con ARNip no específico de control negativo o reactivo de transfección en solitario. Para ambas condiciones no hubo ningún cambio estadísticamente significativo en la viabilidad celular en comparación con el medio de cultivo normal.

[0306] Detección de Pan-caspasa: La actividad de caspasa se detectó mediante análisis microscópico con láser confocal. Las células DU145, PC3 y LNCaP se trataron con ARNip de PAX2 y la actividad se controló basándose en la unión de péptido unido a FAM a caspasas en células que se estaban sometiendo activamente a apoptosis que emiten fluorescencia verde. El análisis de células solamente con medio bajo DIC muestra la presencia de células viables DU145 (A), PC3 (E) y LNCaP (I) a las 0 horas (Figura 9). La excitación con el láser confocal a 488 nm no produjo tinción verde detectable, lo que indica que no había actividad caspasa en DU145 (B), PC3 (F) o LNCaP (J) no tratadas. Después de cuatro días de tratamiento con ARNip de PAX2, las células DU145 (C), PC3 (G) y LNCaP (K) de nuevo eran visibles bajo DIC. Bajo fluorescencia, las células tratadas DU145 (D), PC3 (H) y LNCaP (L) presentaron tinción verde indicando actividad de caspasa.

Efecto de la inhibición de PAX2 sobre factores pro-apoptóticos

65

[0307] Las células DU145, PC3 y LNCaP se trataron con ARNip contra PAX2 durante seis días y la expresión de los genes pro-apoptóticos dependientes e independientes de la regulación de la transcripción de p53 se midió para controlar las rutas de muerte celular. Para BAX había un aumento de 1,81 veces en LNCaP, un aumento de 2,73 veces en DU145 y un aumento de 1,87 veces en PC3 (Figura 10a). Los niveles de expresión de BID aumentaron 5 1,38 veces en LNCaP y 1,77 veces en DU145 (Figura 10b). Sin embargo, los niveles de expresión de BID disminuyeron 1,44 veces en PC3 después del tratamiento (Figura 10c). El análisis de BAD mostró un aumento de 2,0 veces en la expresión de LNCaP, un aumento de 1,38 veces en DU145 y un aumento de 1,58 veces en PC3.

Conclusión

[0308] A pesar de los avances significativos en la terapia del cáncer existe todavía poco progreso en el tratamiento de enfermedad avanzada. El tratamiento farmacológico exitoso del cáncer de próstata requiere el uso de productos terapéuticos con efectos específicos sobre células diana mientras que se mantengan efectos clínicos mínimos en el hospedador. El objetivo de la terapia del cáncer es activar la muerte celular selectiva de tumor. Por lo tanto, la 15 comprensión de los mecanismos en tal muerte es crítica en la determinación de la eficacia de un tratamiento específico.

[0309] La dependencia de la supervivencia de células de cáncer de próstata de la expresión de PAX2 se muestra en esta memoria. Para distinguir entre la muerte observada en la línea celular que expresa p53 LNCaP, la línea mutada 20 en p53 DU145 y la línea anulada de p53 PC3 se examinaron los acontecimientos cadena abajo que siguen a la activación de p53 como resultado de la anulación de PAX2. Se detectó actividad de caspasa en las tres líneas indicando el inicio de la muerte celular programada. Con esto, se examinaron los cambios en la expresión de los genes pro-apoptóticos. En este caso, la expresión de BAX estaba regulada positivamente en las tres líneas celulares independientes del estado de p53. La expresión del factor pro-apoptótico BAD estaba aumentada en las tres líneas 25 después de la inhibición de PAX2. Después del tratamiento con ARNip de PAX2, la expresión de BID estaba aumentada en LNCaP y DU145, pero realmente disminuida en PC3. Esto indica que la muerte celular observada en cáncer de próstata está influida pero no depende de la expresión de p53. El inicio de la apoptosis en células de cáncer de próstata a través de diferentes rutas de muerte celular independientemente del estado de p53 indica que PAX2 inhibe otros supresores tumorales.

30 3. Ejemplo 3: Inhibición del oncogén de PAX2 da como resultado la muerte mediada por DEFB1 de células de cáncer de próstata

Resumen

[0310] La identificación de moléculas específicas de tumor que sirven como dianas para el desarrollo de nuevos fármacos para el cáncer se considera un objetivo importante en la investigación del cáncer. El Ejemplo I demuestra que existe una alta frecuencia de pérdida de expresión de DEFB1 en cáncer de próstata y que la inducción de la expresión de DEFB1 da como resultado apoptosis rápida en cáncer de próstata de estadio negativo a receptor de 40 andrógenos. Estos datos muestran que DEFB1 desempeña un papel en la supresión de tumor de próstata. Además, dado que es un componente de origen natural del sistema inmune del epitelio de próstata normal, se espera que DEFB1 sea un agente terapéutico viable con pocos a ningún efecto secundario. El Ejemplo II demuestra que la inhibición de la expresión de PAX2 da como resultado muerte de célula de cáncer de próstata independiente de p53. Estos datos indican que existe un factor pro-apoptótico adicional o supresor tumoral que está inhibido por PAX2. 45 Además, los datos muestran que el factor oncogénico PAX2, que está sobreexpresado en cáncer de próstata, es un represor transcripcional de DEFB1. El fin de este estudio es determinar si la pérdida de expresión de DEFB1 se debe a expresión aberrante del oncogén PAX2 y si la inhibición de PAX2 da como resultado muerte celular mediada por DEFB1.

50 [0311] Los datos muestran que la pérdida de la expresión de DEFB1 tiene lugar al nivel de la transcripción. Además, el análisis computacional del promotor de DEFB1 mostró la presencia de un sitio de unión a ADN GTTCC para el represor transcripcional PAX2 cerca de la caja TATA de DEFB1 (Figura 1). Los resultados presentados en la presente memoria muestran que PAX2 y DEFB1 muestran varios atributos de dianas de cáncer adecuadas, incluyendo un papel en la supresión de muerte celular. Por lo tanto, DEFB1 desempeña un papel en la inmunidad 55 tumoral y su expresión está modulada mediante la regulación negativa terapéutica del oncogén de PAX2.

Materiales y procedimientos

[0312] Aislamiento de ARN y RT-PCR cuantitativa: Para verificar cambios en los niveles de expresión de DEFB1 se 60 recogió ARN después de 4 días de tratamiento con ARNip de PAX2. En resumen, el ARN total se aisló usando el sistema de aislamiento de ARN total SV (Promega, Madison, WI) de aproximadamente 1×10^6 células recogidas mediante tripsinización. En este caso, las células se lisaron y se aisló el ARN total mediante centrifugación a través de columnas de centrifugación. El ARN total (0,5 µg por reacción) de ambas fuentes se sometió a transcripción inversa hasta ADNc usando cebadores aleatorios (Promega). Se usó la enzima transcriptasa inversa de AMV II (500 65 unidades por reacción; Promega) para la síntesis de la primera cadena y ADN polimerasa de Tfl para la síntesis de

la segunda cadena (500 unidades por reacción; Promega) como por el protocolo del fabricante. En cada caso se usó 50 pg de ADNc para garantizar la reacción de PCR. Se realiza QRT-PCR de dos etapas en ADNc generado usando la transcriptasa inversa MultiScribe del sistema de transcripción inversa TaqMan y la mezcla madre de PCR SYBR Green (Applied Biosystems).

5

[0313] El par de cebadores para DEFB1 se generó a partir de la secuencia publicada de DEFB1 (acceso Nº U50930). Se realizaron cuarenta ciclos de PCR en condiciones convencionales usando una temperatura de hibridación de 56 °C. Además, GAPDH se amplificó como un gen constitutivo para normalizar el contenido inicial de ADNc total. La expresión de DEFB1 se calculó como la proporción de expresión relativa entre DEFB1 y GAPDH y se comparó en líneas celulares antes y después de la anulación de ARNip de la expresión de PAX2. Todas las reacciones se realizaron tres veces por triplicado.

10 **[0314] Generación de la construcción indicadora de DEFB1:** Se usó el plásmido indicador de luciferasa pGL3 para controlar la actividad indicadora de DEFB1. En este caso, una región 160 bases cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción de DEFB1 incluía la caja TATA de DEFB1. La región incluía también la secuencia GTTCC que es necesaria para la unión de PAX2. Los cebadores de PCR se diseñaron para contener sitios de restricción *Kpn*1 y *Nhe*1. Los productos de PCR de promotor de DEFB1 se dirigieron por restricción con *Kpn*1 y *Nhe*1 y se ligaron en un plásmido pGL3 digerido por restricción de forma similar (Figura 2). Las construcciones se introdujeron mediante transfección en *E. coli* y se seleccionaron y expandieron clones individuales. Los plásmidos se aislaron y se verificó la integridad de secuencia de la construcción de DEFB1/pGL3 mediante secuenciación automatizada.

15 **[0315] Ensayo indicador de luciferasa:** En este caso, 1 µg de la construcción indicadora de DEFB1 o el plásmido pGL3 de control se introdujo mediante transfección en 1×10^6 células DU145. A continuación, $0,5 \times 10^3$ células se sembraron en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se dejaron crecer durante una noche. Después se añadió 20 medio fresco que contenía ARNip de PAX2 o solamente medio y las células se incubaron durante 48 horas. Se detectó luciferasa mediante el kit BrightGlo de acuerdo con el protocolo del fabricante (Promega) y las placas se leyeron en un luminómetro de 96 pocillos automatizado Veritas. La actividad del promotor se expresó como luminiscencia relativa.

25 **[0316] Análisis de permeabilidad de membrana:** Se realizó tinción dual con naranja acridina (AO)/bromuro de etidio (EtBr) para identificar cambios en la integridad de la membrana celular, así como células apoptóticas mediante tinción de la cromatina condensada. AO tiñe células viables así como células apoptóticas tempranas, mientras que EtBr tiñe células apoptóticas de estadio tardío que han perdido la permeabilidad de membrana. En resumen, las células se sembraron en 2 porta-objetos de cultivo de cámara (BD Falcon, Estados Unidos). Las células 30 transfectadas con plásmido pIND vacío/pvgRXR o pIND DEFB1/pvgRXR se indujeron durante 24 ó 48 h con medio que contenía Ponasterona A 10 µM. A las células de control se proporcionó medio fresco a las 24 y 48 horas. Para determinar el efecto de la inhibición de PAX2 sobre la integridad de membrana, se trataron porta-objetos de cultivo separados que contenían DU145, PC3 y LNCaP con ARNip de PAX2 y se incubaron durante 4 días. Después de esto, las células se lavaron una vez con PBS y se tiñeron con 2 ml de una mezcla (1:1) de solución de AO (Sigma, 35 Estados Unidos) y EtBr (Promega, Estados Unidos) (5 µg/ml) durante 5 min. Después de la tinción, las células se lavaron de nuevo con PBS. La fluorescencia se visualizó por un microscopio confocal de exploración de láser Zeiss LSM 5 Pascal Vario 2 (Carl Zeiss Jena, Alemania). La rueda de color de excitación contenía bloques de filtro BS505-530 (verde) y LP560 (rojo) lo que permitió la separación de luz verde emitida de AO en el canal verde y luz roja de EtBr en el canal rojo. La salida de potencia de láser y los ajustes de control de ganancia en cada experimento 40 individual fueron idénticos entre células de control e inducidas con DEFB1. La excitación se proporcionó por un láser de gas mixto Kr/Ar a longitudes de onda de 543 nm para AO y 488 nm para EtBr. Los porta-objetos se analizaron con aumento 40X y se almacenaron las imágenes digitales como archivos TIFF no comprimidos y se exportaron a software Photoshop CS (Adobe Systems, San Jose, CA) para el procesamiento de imágenes y la presentación en copia impresa.

45

[0317] Análisis de ChIP de PAX2: La inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) permite la identificación de los sitios de unión para proteínas de unión a ADN basándose en la ocupación *in vivo* de un promotor mediante un factor de transcripción y enriquecimiento de la cromatina unida a factor de transcripción mediante inmunoprecipitación. Se usó una modificación del protocolo descrito por el laboratorio Farnham; también en línea en 50 <http://mcardle.oncology.wisc.edu/farnham/>. Las líneas celulares DU145 y PC3 sobre-expresan la proteína PAX2 pero no expresan DEFB1. Las células se incubaron con PBS que contenía formaldehído a 1,0% durante 10 minutos para entrecruzar las proteínas con ADN. Después las muestras se sonicaron para proporcionar ADN con una longitud promedio de 600 pb. Se incubó cromatina sonicada preclarificada con Dynabeads de proteína A con anticuerpo específico de PAX2 o control "sin anticuerpo" [anticuerpos de control emparejados por isotipo]. Después se 55 recogieron inmunoprecipitados lavados. Después de la inversión de los entrecruzamientos, el ADN se analizó mediante PCR usando cebadores específicos de promotor para determinar si DEFB1 estaba representado en las muestras inmunoprecipitadas de PAX2. Los cebadores se diseñaron para amplificar la región de 160 pb inmediatamente cadena arriba de sitio de inicio de ARNm de DEFB1 que contenía la caja TATA de DEFB1 y el sitio de reconocimiento de PAX2 GTTCC funcional. Para estos estudios, los controles positivos incluyeron PCR de una 60

alícuota de la cromatina de entrada (antes de la inmunoprecipitación, pero entrecruzamientos invertidos). Todas las etapas se realizaron en presencia de inhibidores de proteasa.

Resultados

5 [0318] La inhibición de ARNip de PAX2 aumenta la expresión de DEFB1: el análisis de QRT-PCR de la expresión de DEFB1 antes del tratamiento con ARNip mostró los niveles de expresión relativos de 0,00097 en DU145, 0,00001 en PC3 y 0,00004 LNCaP (Figura 13). Después de la anulación con ARNip de PAX2, la expresión relativa era 0,03294 (aumento de 338 veces) en DU145, 0,00020 (aumento de 22,2 veces) en PC3 y 0,00019 (aumento de 4,92 veces)

10 en LNCaP. Como un control negativo, la línea celular epitelial de próstata humana (hPrEC) que es nula en PAX2 mostró niveles de expresión a 0,00687 antes del tratamiento y 0,00661 después del tratamiento con ARNip confirmando que no había ningún cambio estadístico en la expresión de DEFB1.

15 [0319] El DEFB1 causa la permeabilidad de membrana celular: la integridad de membrana se controla mediante análisis confocal (Figura 14). En este caso, las células intactas se tiñen de verde debido a AO que es permeable a membrana. Además, las células con membranas plasmáticas comprometidas se teñirían en rojo por EtBr que es impermeable a membrana. En este caso, las células no inducidas DU145 (A) y PC3 (D) se tiñeron positivamente con AO y emitieron color verde, pero no se tiñeron con EtBr. Sin embargo, la inducción de DEFB1 tanto en DU145 (B) como en PC3 (E) dio como resultado la acumulación de EtBr en el citoplasma a las 24 horas indicado por la tinción 20 roja. A las 48 horas, DU145 (C) y PC3 (F) poseyeron núcleos condensados y aparecieron en amarillo, lo que se debía a la presencia de tinción tanto verde como roja resultante de la acumulación de AO y EtBr, respectivamente.

25 [0320] La inhibición de PAX2 da como resultado permeabilidad de membrana: Las células se trataron con ARNip de PAX2 durante 4 días y se controló de nuevo la integridad de membrana mediante análisis confocal. En este caso, tanto DU145 como PC3 poseían núcleos condensados y aparecían en amarillo. Sin embargo, el citoplasma y los núcleos de las células LNCaP permanecieron verdes después del tratamiento con ARNip. También la tinción roja en la periferia celular indica el mantenimiento de la integridad de la membrana celular. Estos hallazgos indican que la inhibición de PAX2 da como resultado muerte celular mediada por DEFB1 específicamente en células DU1145 y PC3, pero no LNCaP. La muerte observada en LNCaP se debe a la transactivación de p53 de tipo silvestre existente 30 en LNCaP después de la inhibición de PAX2.

35 [0321] La inhibición por ARNip de PAX2 aumenta la actividad del promotor de DEFB1: El análisis de la actividad de promotor de DEFB1 en células DU145 que contenían la construcción DEFB1/pGL3 mostró un aumento de 2,65 veces en unidades de luz relativas después de 48 horas de tratamiento en comparación con células no tratadas. En células PC3 había un aumento de 3,78 veces en las unidades de luz relativas en comparación con las células no tratadas.

40 [0322] PAX2 se une al promotor de DEFB1: Se realizó el análisis de ChIP en células DU145 y PC3 para determinar si el represor transcripcional de PAX2 está unido al promotor de DEFB1 (Figura 15). El carril 1 contiene un marcador de peso molecular de 100 pb. El carril 2 es un control positivo que representa una región de 160 pb del promotor de DEFB1 amplificado a partir de DU145 antes del entrecruzamiento y la inmunoprecipitación. El carril 3 es un control negativo que representa la PCR realizada sin ADN. Los carriles 4 y 5 son controles negativos que representan PCR de inmunoprecipitaciones realizadas con IgG de DU145 y PC3 entrecruzada, respectivamente. La amplificación por PCR de 25 pg de ADN (carriles 6 y 8) y 50 pg de ADN (carril 7 y 9) inmunoprecipitó con anticuerpo anti-PAX2 45 después del entrecruzamiento muestra un fragmento de promotor de 160 pb en DU145 y PC3, respectivamente.

Conclusión

50 [0323] Los presentes datos novedosos son los primeros en desvelar el papel de DEFB1 en la inmunidad tumoral de cáncer de próstata. Los datos también muestran que el factor oncogénico PAX2 suprime la expresión de DEFB1. Una de las evidencias de la citotoxicidad de defensina es la alteración de la integridad de membrana. Los presentes resultados muestran que la expresión ectópica de DEFB1 en células de cáncer de próstata da como resultado una pérdida de potencia de membrana debido a membranas celulares comprometidas. Se observa el mismo fenómeno después de inhibir la expresión de la proteína PAX2. También se realizó análisis de ChIP y se confirmó que PAX2 55 está unido al promotor de DEFB1 dando como resultado la represión de la expresión de DEFB1. Por lo tanto, la supresión de la expresión o la función de PAX2 da como resultado el restablecimiento de la expresión de DEFB1 y posteriormente muerte celular mediada por DEFB1. Además, los presentes datos establecen la utilidad de DEFB1 como una terapia dirigida para el tratamiento del cáncer de próstata mediante la inmunidad innata.

60 4. Ejemplo 4: La expresión de DEFB1 da como resultado contracción del tumor

[0324] La capacidad antitumoral de DEFB1 se evalúa inyectando células tumorales que sobreexpresan DEFB1 en ratones atípicos. DEFB1 se clona en el vector pBI-EGFP, que tiene un promotor responsable de tetraciclina bidireccional. Se generan líneas celulares Tet-Off introduciendo mediante transfección pTet-Off en células DU145, 65 PC3 y LNCaP y seleccionando con G418. El plásmido pBI-EGFP-DEFB1 se introduce mediante co-transfección con

pTK-Hyg en las líneas celulares Tet-off y se selecciona con higromicina. Se usan solamente suspensiones de una sola célula con una viabilidad de > 90%. Cada animal recibe aproximadamente 500.000 células administradas por vía subcutánea en el flanco derecho de ratones atípicos hembra. Existen dos grupos, un grupo de control al que se inyectan clones sólo de vector y un grupo al que se inyectan los clones que sobre-expresan DEFB1. 35 ratones 5 están en cada grupo como se determinado por un estadista. Los animales se pesan dos veces por semana, el crecimiento tumoral se controla mediante calibradores y se determinan los volúmenes del tumor usando la siguiente fórmula: volumen = 0,5 x (anchura) 2 x longitud. Todos los animales se sacrifican mediante sobredosis de CO₂ cuando el tamaño del tumor alcanza 2 mm³ o 6 meses después del implante; los tumores se extirpan, pesan y 10 almacenan en formalina tamponada neutra para la examinación patológica. Las diferencias en el crecimiento del tumor entre los grupos se caracterizan mediante descripción a través de estadísticas resumidas y presentaciones gráficas. Se evalúa la significación estadística con el ensayo t o un equivalente no paramétrico.

5. Ejemplo 5: La expresión de ARNip de PAX2 da como resultado la regulación positiva de la expresión de DEFB1 y la contracción de tumor *in vivo*

[0325] Se utilizan oligonucleótidos de molde de ARNip de PAX2 de horquilla utilizados en los estudios *in vitro* para examinar el efecto de la regulación positiva de la expresión de DEFB1 *in vivo*. La cadena con sentido y antisentido (véase la Tabla 3) se hibridan y se cloran en el vector de expresión de ARNip pSilencer 2.1 U6 hygro (Ambion) bajo el control del promotor de ARN pol III U6 humano. El plásmido clonado se secuencia, verifica e introduce mediante 15 transfección en líneas celulares PC3, Du145 y LNCaP. Se clona ARNhC mezclado y se usa como un control negativo en este estudio. Se seleccionan las colonias resistentes a higromicina, las células se introducen en los ratones por vía subcutánea y se controla el crecimiento del tumor como se ha descrito anteriormente.

6. Ejemplo 6: Los inhibidores de molécula pequeña de la unión de PAX2 da como resultado la regulación positiva de la expresión de DEFB1 y la contracción de tumor *in vivo*

[0326] La secuencia de reconocimiento de ADN para la unión a PAX2 reside en el promotor de DEFB1 entre los nucleótidos -75 y -71 [+1 se refiere al sitio de inicio de la transcripción]. Se proporcionan oligonucleótidos cortos complementarios al dominio de unión a ADN de PAX2. Los ejemplos de tales oligonucleótidos incluyen los 30 oligonucleótidos de 20 unidades y 40 unidades que contienen la secuencia de reconocimiento GTTCC proporcionada más adelante. Estas longitudes se seleccionaron arbitrariamente y se espera que otras longitudes sean eficaces como bloqueantes de la unión. Como un control negativo se diseñaron oligonucleótidos con una secuencia distorsionada (CTCTG) para verificar la especificidad. Los oligonucleótidos se introducen mediante transfección en las células de cáncer de próstata y las células HPrEC con reactivo lipofectamine o reactivo de 35 transfección Codebreaker (Promega, Inc). Para confirmar las interacciones de ADN-proteína, los oligonucleótidos bicatenarios se marcarán con [³²P] dCTP y se realizan ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética. Además, la expresión de DEFB1 se controla mediante QRT-PCR y análisis de western después del tratamiento con oligonucleótidos. Finalmente, la muerte celular se detecta mediante ensayo de MTT y citometría de flujo como se ha descrito previamente.

40 Secuencia de reconocimiento Nº 1: CTCCCTTCAGTTCCGTCGAC (SEC ID Nº: 9)
 Secuencia de reconocimiento Nº 2: CTCCCTTCACCTTGTCGAC (SEC ID NO: 10)
 Secuencia distorsionada Nº 1: CTCCCTTCACTCTGGTCGAC (SEC ID Nº: 11)

45 Secuencia de Reconocimiento nº 3:

5'-TTAGCGATTAGAAGTTCACCCCTTGACTGTGGCACCTCCC-3' (SEC ID Nº: 12)

Secuencia de Reconocimiento nº 4:

ACTGTGGCACCTCCCTCACCTTGTCGACGAGGTTGTGC (SEC ID Nº: 13)

Secuencia Distorsionada nº 2:

ACTGTGGCACCTCCCTCACCTGTGTCGACGAGGTTGTGC (SEC ID Nº: 14)

50 [0327] Otros ejemplos de oligonucleótidos de la invención incluyen:

Secuencia de reconocimiento Nº 1: 5 '-AGAACGTTCACCCCTTGACTGT-3' (SEC ID Nº 24)
 Secuencia de reconocimiento Nº 2: 5 '-AGAACGTTCACGTTCCACTGT-3' (SEC ID Nº 25)
 55 Secuencia distorsionada Nº 1: 5 '-AGAACGTTCACGCTACTGT-3' (SEC ID Nº: 26)

Secuencia de Reconocimiento nº 3:

5'-TTAGCGATTAGAAGTTCACCCCTTGACTGTGGCACCTCCC-3' (SEC ID Nº: 27)

Secuencia de Reconocimiento nº 4:

5'-GTTAGCGATTAGAAGTTCACGTTCCACTGTGGCACCTCCC-3' (SEC ID N°:

28)

Secuencia Distorsionada nº 2:

5'-GTTAGCGATTAGAAGTTCACGCTCTACTGTGGCACCTCCC-3' (SEC ID N°:

29)

[0328] Este conjunto de oligonucleótidos inhibidores alternativos representa la secuencia de reconocimiento (junto con la secuencia central de CCTTG) para el dominio de unión de PAX2 y homeocaja. Estas incluyen secuencias reales del promotor de DEFB1.

[0329] El gen de PAX2 se requiere para el crecimiento y la supervivencia de diversas células cancerosas incluyendo próstata. Además, la inhibición de la expresión de PAX2 da como resultado muerte celular mediada por el componente de la inmunidad innata DEFB1. La supresión de la expresión y actividad de DEFB1 se consigue mediante la unión de la proteína de PAX2 a un sitio de reconocimiento de GTTCC en el promotor de DEFB1. Por lo tanto, esta ruta proporciona una diana terapéutica viable para el tratamiento de cáncer de próstata. En este procedimiento, las secuencias se unen al sitio de unión a ADN de PAX2 y bloquean la unión de PAX2 al promotor de DEFB1, permitiendo así la expresión y actividad de DEFB1. Las secuencias oligonucleotídicas y el experimento que se ha descrito anteriormente son ejemplos de y demuestran un modelo para el diseño de fármacos inhibidores de PAX2 adicionales.

[0330] Dado que la secuencia GTTCC existe en interleucina-3, interleucina-4, el receptor de insulina y otros, PAX2 regula asimismo su expresión y actividad. Por lo tanto, los inhibidores de PAX2 desvelados en la presente memoria tienen utilidad en varias otras enfermedades incluyendo las relacionadas directamente con inflamación incluyendo prostatitis e hipertrofia prostática benigna (BPH).

7. Ejemplo 7: La pérdida de la expresión de DEFB1 da como resultado tumorigénesis aumentada

[0331] Generación de pérdida de función en ratones: El sistema Cre/loxP ha sido útil para aclarar los mecanismos moleculares subyacentes a la carcinogénesis de próstata. En este caso se usa un KO condicional de Cre de DEFB1 para la alteración inducible dentro de la próstata. El KO condicional de Cre de DEFB1 implica la generación de un vector de direccionamiento que contiene sitios loxP que flanquean los exones que codifican DEFB1, células ES diana con este vector y la generación de ratones químicos de línea germinal a partir de estas células ES diana. Los heterocigotos se aparean con transgénicos Cre específicos de próstata y se usa el entrecruzamiento heterocigoto para generar ratones KO de DEFB1 específicos de próstata. Se ha observado que cuatro compuestos químicos genotóxicos inducen carcinomas de próstata en roedores: N-metil-N-nitrosourea (MNU), N-nitrosobis 2-oxopropil amina (BOP), 3,2X-dimetil-4-amino-bifenil (MAB) y 2-amino-1-metil-6-fenilimidazol 4,5-bipiridina (PhIP). Los ratones transgénicos de DEFB1 se tratan con estos compuestos carcinogénicos mediante administración intragástrica o inyección i.v. para estudios de inducción de adenoma y adenocarcinoma de próstata. Las muestras de próstata se estudian para diferencias en el crecimiento tumoral y cambios en la expresión génica mediante análisis histológicos, inmunohistológicos, de ARNm y de proteína.

[0332] Generación de ratones GOF: para ratones GOF inducibles con PAX2, se administra a crías de la misma camada GOF de PAX2 (bi-transgénicos) y de tipo silvestre (mono-transgénicos) doxiciclina (Dox) a partir de las 5 semanas de edad para inducir expresión de PAX2 específica de próstata. En resumen, los ratones mono-transgénicos PROBASIN-rtTA (expresión específica de célula de próstata de inductor de rtTA dependiente de tet) se cruzan con las líneas respondedoras transgénicas de PAX2 de los inventores. Para la inducción, los ratones bi-transgénicos se alimentan con Dox a través del agua de bebida (500 mg/l preparada de forma fresca dos veces por semana). Los experimentos iniciales verifican bajos niveles de fondo, buena inducibilidad y expresión específica de tipo celular de PAX2 y el indicador de EGFP usando la línea fundadora transgénica en ratones bi-transgénicos. Con respecto a los tamaños del grupo experimental, 5-7 individuos emparejados por edad y sexo en cada grupo (tipo silvestre y GOF) permiten significación estadística. Para todos los animales en este estudio se recogen tejidos de próstata inicialmente con intervalos semanales para el análisis y la comparación para determinar parámetros temporales carcinogénicos.

[0333] Genotipado de PCR, RT-PCR y qPCR: los ratones transgénicos PROBASIN-rtTA se genotipan usando los siguientes cebadores y condiciones de PCR:

PROBASIN5 (directo) 5'-ACTGCCATTGCCAACAC-3' (SEC ID N° 48);
60 RTTA3 (inverso) 5'-AAAATCTGCCAGCTTCCCC-3' (SEC ID N° 49);

- 95 °C de desnaturalización durante 5 min, seguido de 30 ciclos de 95 °C durante 30 s, 57 °C durante 30 s, 72 °C durante 30 s, seguido de una extensión de 5 min a 72 °C, proporcionando un producto de 600 pb. Los ratones transgénicos inducibles con PAX2 se genotipan usando los siguientes cebadores y condiciones de PCR: PAX2 dir 5'-GTCGGTTACGGAGCGGACCGGAG-3' (SEC ID Nº 50); Inv5'IRES 5'-TAACATATAGACAAACGCACACCG-3' (SEC ID Nº 51); 95 °C de desnaturalización durante 5 min, seguido de 34 ciclos de 95 °C durante 30 s, 63 °C durante 30 s, 72 °C durante 30 s, seguido de una extensión de 5 min a 72 °C, proporcionando un producto de 460 pb. Se genotipan los hemicigotos de Immortomouse usando los siguientes cebadores y condiciones de PCR: Immol1, 5'-GCGCTTGTC GCCATTGTATTCT-3' (SEC ID Nº 52); Immol2, 5'-GTCACACCACAGAAGTAAGGTTCC-3' (SEC ID Nº 53); 94 °C 30 s, 58 °C 1 min, 72 °C 1 min 30 s, 30 ciclos para proporcionar una banda de transgen de ~ 1 kb.
- 5 Para genotipar ratones anulados de PAX2, los siguientes cebadores y condiciones de PCR se usan: PAX2 dir 5'-GTCGGTTACGGAGCGGACCGGAG-3' (SEC ID Nº 54); PAX2Inv 5'-CACAGAGCATTGGCGATCTCGATGC - 3' (SEC ID Nº 55); 94 °C 1 min, 65 °C 1 min, 72 °C 30 seg, 36 ciclos para proporcionar una banda de 280 pb.
- 10

[0334] Estudios con animales de péptido de DEFB1: A ratones atípicos (desnudos) machos de seis semanas de edad adquiridos en Charles River Laboratories se inyectan por vía subcutánea a través de la escápula 10^6 células PC3 viables. Una semana después de la inyección, los animales se adjudican aleatoriamente a uno de tres grupos - grupo I: control; grupo II: inyecciones intraperitoneales de DEFB1, 100 µg/día, 5 días a la semana, durante las semanas 2-14; grupo III: inyecciones intraperitoneales de DEFB1, 100 mg/día, 5 días a la semana, durante las semanas 8-14. Los animales se mantienen en un alojamiento estéril, cuatro animales en una jaula y se observan con 20 una base diaria. Con intervalos de 10 días, los tumores se miden usando calibradores y se calculan los volúmenes de los tumores usando $V = (L \times W^2)/2$.

Tabla 2. Secuencias de cebadores de QRT-PCR

	Con sentido (5'-3')	
β-actina	5'-CCTGGCACCCAGCACAAAT-3'	SEC ID Nº 30
DEFB 1	5'-GTTGCCTGCCAGTCGCCATGAGAACCTTCCTAC-3'	SEC ID Nº 31
	Antisentido (5'-3')	
β-actina	5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3'	SEC ID Nº 32
DEFB 1	5'-TGGCCTCCCTCTGTAACAGGTGCCTGAATT- 3'	SEC ID Nº 33

25

Tabla 3. Secuencias de ARNip de PAX2. Un grupo de cuatro ARNip se utilizó para inhibir la expresión de la proteína de PAX2.

	Con sentido (5'-3')	
Secuencia A	5'-GAAGUCAAGUCGAGUCUUUU-3'	SEC ID Nº 15
Secuencia B	5 '-GAGGAACGUGAUGAAGAUUU - 3'	SEC ID Nº 3
Secuencia C	5 '-GGACAAGAUUGCUGAAUACUU - 3'	SEC ID Nº 5
Secuencia D	5 '-CAUCAGAGCACAUCAAUCUU - 3'	SEC ID Nº 7
	Antisentido (5'-3')	
Secuencia A	5 '-AUAGACUCGACUUGACUUCUU - 3'	SEC ID Nº 2
Secuencia B	5 '-AUCUUCAUCACGUUUUCCUCUU - 3'	SEC ID Nº 4
Secuencia C	5 '-GUAAUCAGCAAUCUUGUCCUU - 3'	SEC ID Nº 6
Secuencia D	5 '-GAUUUGAUGUGCUCUGAUGUU - 3'	SEC ID Nº 8

30 **Tabla 4.** Cebadores de RT-PCR cuantitativa. Secuencias de nucleótidos de cebadores usados para amplificar PAX2 y GAPDH

	Con sentido (5'-3')	
GAPDH	5 '-CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA - 3'	SEC ID Nº 16
BAD	5 '-CTCAGGCCTATGCCAAAAAGAGGA - 3'	SEC ID Nº 17
BID	5 '-AACCTACGCACCTACGTGAGGAG - 3'	SEC ID Nº 18
BAX	5 '-GACACCTGAGCTGACCTTG - 3'	SEC ID Nº 19
	Antisentido (5'-3')	
GAPDH	5 '-TCTAGACGGCAGGTCAAGGTCAACC - 3'	SEC ID Nº 20
BAD	5 '-GCCCTCCCTCCAAAGGAGAC - 3'	SEC ID Nº 21
BID	5 '-CGTTCAGTCCATCCCATTCTG - 3'	SEC ID Nº 22
BAX	5 '-GAGGAAGTCCAGTGTCCAGC - 3'	SEC ID Nº 23

8. Ejemplo 8: Direccionamiento de la expresión de PAX2 para la quimioprevención de neoplasia intraepitelial y cáncer

Resumen

5 [0335] La acumulación de mutaciones y la pérdida de las funciones del control celular causan cambios fenotípicos progresivos desde histología normal a un pre-cáncer temprano tal como neoplasia intraepitelial (IEN) a IEN cada vez más grave a cáncer superficial y finalmente a enfermedad invasiva. Aunque este proceso puede ser relativamente agresivo en algunos casos, generalmente tiene lugar de forma relativamente lenta a lo largo de años e incluso 10 décadas. Como se ha descrito por Weinstein y otros, la adicción de oncogenes es la dependencia fisiológica de células cancerosas de la activación o sobreexpresión continuada de oncogenes individuales para mantener el fenotipo maligno. Esta dependencia tiene lugar en el medio de los otros cambios que marcan la progresión neoplásica. La adicción y la dependencia de las células cancerosas del oncogén PAX2 para el crecimiento y la supervivencia celular es uno de tales ejemplos. Por el contrario, la ausencia de genes supresores de tumor tales 15 como DEFB 1 que está reprimido transcripcionalmente mediante PAX2 otorga una adicción pro-cáncer similar.

[0336] La quimioprevención del cáncer se define como la prevención del cáncer o el tratamiento en el estado pre-cáncero o incluso antes. El largo período de progresión hasta cáncer invasivo es una importante oportunidad científica pero también un obstáculo económico para mostrar el beneficio clínico de fármacos quimiopreventivos 20 candidatos. Por lo tanto, un componente importante de la investigación de desarrollo de agentes quimiopreventivos en años recientes ha sido identificar criterios de valoración o biomarcadores anteriores (a cáncer) que predicen de forma precisa un beneficio clínico del agente o efecto reductor de incidencia del cáncer. En muchos cánceres, IEN es un criterio de valoración temprano tal como en el cáncer de próstata. Dado que la ruta de PAX2/DEFB1 está desregulada durante IEN y probablemente a un estado histopatológico aún más temprano hace del mismo un 25 biomarcador predictivo potente y una diana excelente para la quimioprevención del cáncer. Se muestran varios compuestos que suprimen PAX2 y aumentan la expresión de DEFB1 que pueden tener utilidad como agentes quimiopreventivos para el cáncer de próstata.

Antecedentes

30 [0337] Los genes de PAX son capaces de actuar como proto-oncogenes mediante las alteraciones estructurales de factores de transcripción y genes que regulan el crecimiento y apoptosis celular dando como resultado una fuerte señal de supervivencia en cáncer de próstata. Además, se ha demostrado que varios cánceres tienen expresión aberrante de PAX2 (Figura 18). La angiotensina II (AngII) es un regulador importante de la presión sanguínea y la 35 homeostasis cardiovascular y se reconoce como un potente mitógeno. La AngII media sus efectos biológicos mediante la unión a dos subtipos de receptores, el receptor de angiotensina de tipo I (AT1R) y el receptor de angiotensina tipo II (AT2R) que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G pero que tienen diferente distribución tisular y rutas de señalización intracelular. Además de sus efectos sobre la presión sanguínea, se ha demostrado que AngII desempeña un papel en diversas situaciones patológicas que implican remodelado 40 tisular, tales como cicatrización, hipertrofia cardiaca y desarrollo. De hecho, estudios recientes han mostrado la expresión local de varios componentes del sistema de renina-angiotensina (RAS) en diversas células y tejidos de cáncer incluyendo la próstata. La regulación positiva de AT1R proporciona una ventaja considerable a las células cancerosas que han aprendido a evadir la apoptosis y elementos reguladores del crecimiento.

45 [0338] Este estudio demuestra que la regulación positiva del oncogén de PAX2 en cáncer de próstata se debe a señalización de RAS desregulada. La expresión de PAX2 está regulada por la ruta de señalización de ERK 1/2 que está mediada por el receptor de angiotensina de tipo I. Además, el bloqueo de AT1R con Losartan (Los) suprime la expresión de PAX2. Además, AICAR, que es un activador de AMPK, también se ha demostrado prometedor como un potencial inhibidor de PAX2. En conjunto, estos estudios implican intensamente estas clases de fármacos como 50 potenciales supresores de la expresión de PAX2 y pueden servir finalmente como novedosos agentes de quimioprevención (Tabla 5).

Tabla 5. Cánceres que expresan PAX2 como candidatos para estrategias de quimioprevención

Cánceres que expresan PAX2	Nuevos casos estimados en EEUU ²²	Muertes estimadas en EEUU ²²	Nuevos casos globales estimados	Muertes estimadas globales
Próstata	234.460	27.350	679.023	221.002
Mama	214.600	41.430	1.151.298	410.712
Ovárico	20.180	15.310	204.500	124.860
Renal	38.890	12.840	208.479	101.895
De cerebro	12.820	18.820	189.485	141.650
Cervical	9.710	3.700	493.243	273.505
Vejiga	61.420	13.060	356.556	145.009
Leucemia	35.020	22.280	300.522	222.506
Sarcoma de Kaposi	Datos no disponibles	Datos no disponibles	Datos no disponibles	Datos no disponibles

TOTAL (aproximadamente)	627.100	154.790	3.583.106	1.641.139
Hasta la fecha se ha demostrado que varios cánceres expresan de forma aberrante PAX2. La quimioprevención mediante la expresión dirigida de PAX2 puede tener un impacto significativo sobre las muertes relacionadas con cáncer.				

Materiales y procedimientos

[0339] **Cultivo celular:** las líneas celulares DU145 se cultivaron en medio DMEM y PC3 se cultivaron en medio F12 (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY). Los medios de cultivo para las tres líneas se complementó con suero fetal bovino a 10% (Life Technologies) (v/v). Las células hPrEC se cultivaron en medio basal de epitelio de próstata (Cambrex Bio Science, Inc., Walkersville, MD). Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37 °C y CO₂ a 5%.

[0340] **Reactivos y tratamientos:** las células se trataron con 5 o 10 µM de AngII, 5 µM del antagonista de ATR1 Los, 5 µM del antagonista de ATR2 PD123319, 25 µM del inhibidor de MEK U0126, 20 µM del inhibidor de MEKBRK PD98059 o 250 µM del inductor de AMP quinasa AICAR.

[0341] **Análisis de western:** en resumen, las células se recogieron mediante tripsinización y se lavaron dos veces con PBS. El tampón de lisis se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Sigma) y después se añadió a las células. Después de un período de incubación de 15 minutos a 4 °C en un agitador orbital, los lisados celulares se recogieron y centrifugaron durante 10 minutos a 12000xg para sedimentar los restos celulares. Después, el sobrenadante que contenía proteínas se recogió y cuantificó. A continuación, 25 µg de extracto de proteínas se cargó en un SDS-PAGE de gradiente de 8-16% (Novex). Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF y después se bloquearon con leche en polvo desnataada a 5% en TTBS (Tween 20 a 0,05% y Tris-Cl 100 mM) durante 1 hora. Después, las transferencias se sondaron con anticuerpo primario (anti-PAX2, -fosfo-PAX2, -JNK, -fosfo-JNK, -ERK/2 o -fosfo-RK1/2) (Zymed, San Francisco, CA) a diluciones 1:1000-2000. Después del lavado, las membranas se incubaron con anticuerpo anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano rusticano (HRP) (dilución 1:5000; Sigma) y la detección de señal se visualizó usando reactivos de quimioluminiscencia (Pierce) en un Alpha Innotech Fluorchem 8900. Como un control se separaron y re-sondaron las transferencias con anticuerpo primario de ratón anti-β-actina (1:5000; Sigma-Aldrich) y anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con HRP (1:5000; Sigma-Aldrich), y se visualizó de nuevo la detección de señal.

[0342] **Análisis de QRT-PCR:** Se realizó RT-PCR en tiempo real cuantitativa para verificar los cambios en la expresión génica después de la anulación de PAX2 en líneas celulares de cáncer de próstata PC3 y DU145 y las células epiteliales de próstata normales hPrEC. Aproximadamente 1 × 10⁶ células se recogieron mediante tripsinización y las células se enjuagaron en PBS. Después, las células se lisaron y se aisló el ARN total mediante centrifugación a través de columnas de centrifugación usando el sistema de aislamiento de ARN total SV (Promega). Se generó ADNc (0,5 µg por reacción) mediante transcripción inversa mediante el cebador Oligo (dT) 15 (Promega) y la enzima transcriptasa inversa II de AMV (500 unidades por reacción; Promega) para la síntesis de la primera cadena y ADN polimerasa de Tfl para la síntesis de la segunda cadena (500 unidades por reacción; Promega) como por el protocolo del fabricante. Típicamente se usaron 50 pg de cada ADNc por cada reacción de PCR subsiguiente. Se realizó QRT-PCR de dos etapas en ADNc generado usando la transcriptasa inversa MultiScribe del sistema de transcripción inversa TaqMan y la mezcla madre de PCR SYBR Green (PE Biosystems). Las reacciones se realizaron en una placa de reacción de 96 pocillos MicroAmp Optical (PE Biosystems). Se realizaron cuarenta ciclos de PCR en condiciones convencionales usando una temperatura de hibridación de 60 °C. La cuantificación se determinó mediante el número de ciclos en el que comenzó la amplificación exponencial (valor umbral) y se promedió a partir de los valores obtenidos de las repeticiones por triplicado. Había una relación inversa entre el nivel de mensaje y el valor umbral. Además se usó GADPH como un gen constitutivo para normalizar el contenido inicial de ADNc total. La expresión relativa se calculó como la proporción entre cada gen y GADPH. Todas las reacciones se realizaron por triplicado.

[0343] **Incorporación de timidina:** La proliferación de células se determinó mediante [³H] timidina ribotida ([³H] TdR) incorporación en ADN. 0,5 × 10⁶ células/pocillo de suspensión de células DU145 se sembraron en sus medios apropiados. Las células se incubaron durante 72 h con o sin la presencia de AngII a las concentraciones indicadas. Las células se expusieron a 37 kBq/ml [metil-³H] timidina en el mismo medio durante 6 h. Las células adherentes se fijaron con ácido tricloroacético a 5% y se lisaron en tampón de lisis SDS/NaOH durante una noche. La radiactividad se midió mediante contador de centelleo líquido Beckman LS3801 (Canadá). El cultivo celular en suspensión se recogió mediante el dispositivo de recogida de células (Packard Instrument. Co., Meriden, CT) y se midió la radiactividad mediante el contador de escintilación líquida microbeta 1450 (PerkinElmer Life Sciences).

[0344] **Análisis estadístico:** Las diferencias estadísticas se evaluaron usando el ensayo t de Student para valores desapareados. Los valores de P se determinaron mediante un cálculo de dos lados y un valor de P inferior a 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

- [0345]** Para investigar el efecto de AngII sobre la expresión de PAX2 en células de cáncer de próstata DU145, la expresión de PAX2 se examinó después del tratamiento con AngII a lo largo de un periodo de 30 min a 48 horas.
- 5 Como se muestra en la Figura 19, la expresión de PAX2 aumentó progresivamente a lo largo del tiempo después del tratamiento con AngII. El bloqueo de la señalización de RAS tratando DU145 con Los redujo significativamente la expresión de PAX2 (Figura 20A). En este caso, la expresión de PAX2 era de 37% después de 48 horas y era de 50% después de 72 horas de tratamiento con Los en comparación con las células DU145 de control no tratadas (Figura 21). Se sabe que el receptor de AT2R se opone a la acción del AT1R. Por lo tanto, el efecto del bloqueo del receptor AT2R sobre la expresión de PAX2 se examinó. El tratamiento de DU145 con el bloqueante de AT2R PD123319 dio como resultado un aumento de siete veces en la expresión de PAX2 después de 48 horas y un aumento de 8 veces después de 96 horas de tratamiento (Figura 20B). En conjunto, estos hallazgos demuestran que la expresión de PAX2 está regulada por el receptor de ATR1.
- 10 **[0346]** Se sabe que AngII afecta directamente a la proliferación de las células de cáncer de próstata mediante la activación mediada por ATIRE de MAPK y fosforilación de STAT3. El tratamiento de DU145 con AngII dio como resultado un aumento de dos a tres veces el índice de proliferación (Figura 21). Sin embargo, el tratamiento con Los disminuyó los índices de proliferación en 50%. Además, el bloqueo del receptor de AT1R pre-tratando con Los durante 30 min suprimió el efecto de AngII sobre la proliferación.
- 15 **[0347]** Para examinar adicionalmente el papel de la señalización de AT1R en la regulación de la expresión y activación de PAX2, se examinó el efecto del bloqueo de diversos componentes de la ruta de señalización de MAP quinasa sobre la expresión de PAX2. En este caso, las células DU145 tratadas con el inhibidor de MEK U0126 dieron como resultado una reducción significativa de la expresión de PAX2 (Figura 22). Además, el tratamiento con 20 el inhibidor de MEK/ERK PD98059 dio como resultado también PAX2 disminuido. El tratamiento de células DU145 con Los no tuvo ningún efecto sobre los niveles de proteína ERK, pero redujo la cantidad de fosfo-ERK (Figura 23A). Sin embargo, el tratamiento de DU145 con Los dio como resultado una reducción significativa de la expresión de PAX2. Se observaron resultados similares con U0126 y PD98059. Se sabe también que la expresión de PAX2 está regulada por STAT3 que es una diana cadena abajo de ERK. El tratamiento de DU145 con Los, U0126 y PD98059 25 redujo los niveles de proteína fosfo-STAT3 (Figura 23C). Estos resultados demuestran que PAX2 está regulado mediante AT1R en células de cáncer de próstata.
- 30 **[0348]** Además se examinó el efecto de la señalización de AT1R sobre la activación de PAX2 por JNK. El tratamiento de DU145 con Los, U0126 y PD98059 dieron todos como resultado una disminución o supresión significativa de los niveles de proteína fosfo-PAX2 (Figura 24A). Sin embargo, Los y U0126 no disminuyeron los niveles de proteína fosfo-JNK (Figura 24B). Por lo tanto, la disminución en fosfo-PAX2 parece deberse a niveles disminuidos de PAX2, pero no a fosforilación disminuida.
- 35 **[0349]** Se usa ampliamente 5-aminoimidazol-4-carboxamida-1-β-4-ribofuranósido (AICAR) como un activador de AMP-quinasa, que regula la homeostasis de energía y la respuesta a estrés metabólico. Recientes informes han indicado la acción anti-proliferativa y pro-apoptótica de AMPK activada usando agentes farmacológicos o sobreexpresión de AMPK. Se ha demostrado que la activación de AMPK induce apoptosis en células de cáncer gástrico humano, células de cáncer de pulmón, cáncer de próstata, células pancreáticas y células de carcinoma hepático y aumenta la apoptosis inducida por estrés oxidativo en células de neuroblastoma de ratón mediante 40 diversos mecanismos que incluyen la inhibición de la ruta de sintasa de ácidos grasos e inducción de quinasas de estrés y caspasa 3. Además, el tratamiento de células de cáncer de próstata PC3 aumentó la expresión de las proteínas p21, p27, p53 y la inhibición de la ruta de PI3K-Akt. Todas estas rutas están reguladas directa o indirectamente por PAX2. El tratamiento de las células de cáncer de próstata con AICAR dio como resultado la supresión de la expresión de PAX2 (Figura 23B) así como su forma activada fosfo-PAX2 (Figura 24A). Además, 45 fosfo-STAT3 que regula la expresión de PAX2 también estaba suprimido (Figura 23C).
- 50 **[0350]** Finalmente se planteó la hipótesis de que la señalización aberrante de RAS que conduce a la regulación positiva y sobreexpresión de PAX2 suprime la expresión del gen supresor de tumor DEFB1. Para investigar esto, el cultivo primario hepitelial de próstata normal hPrEC se trató con AngII y se examinaron los niveles de expresión tanto 55 de PAX2 como de DEFB1. Se descubrió una relación inversa entre la expresión de DEFB1 y PAX2 en células de próstata normales frente a células de cáncer de próstata. HPrEC no tratadas mostraron una expresión de PAX2 relativa de 10% en comparación con la expresión en células de cáncer de próstata PC3. Por el contrario, el PAX2 no tratado mostró solamente una expresión de DEFB1 relativa de 2% en comparación con la expresión en hPrEC. Después de 72 horas de tratamiento con 10 μM de AngII, había una disminución de 35% en la expresión de DEFB1 60 en comparación con hPrEC no tratado y a las 96 horas había una disminución de 50% en la expresión de DEFB1 en comparación con células hPrEC no tratadas. Sin embargo, había un aumento de 66% en la expresión de PAX2 a las 72 horas y a las 96 horas había un aumento de 79% en la expresión de PAX2 en comparación con células hPrEC no tratadas. Además, el aumento en la expresión de PAX2 en hPrEC después de 72 horas era de 77% de los niveles de PAX2 observados en las células de cáncer de próstata PC3. Después de 96 horas del tratamiento con AngII, la 65 expresión de PAX2 era de 89% de la expresión de PAX2 en PC3. Estos resultados demuestran que la señalización

desregulada de RAS suprime la expresión de DEFB1 mediante la regulación positiva de la expresión de PAX2 en células de próstata.

Discusión

5 [0351] El sistema de renina-angiotensina AngII es un regulador importante de la presión sanguínea y la homeostasis cardiovascular y está reconocido como un potente mitógeno. Ang II media sus efectos biológicos mediante la unión a dos subtipos de receptores, AT1R y AT2R que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteína G pero que tienen diferente distribución tisular y rutas de señalización intracelular. La regulación positiva de AT1 proporciona una considerable ventaja a células cancerosas que han aprendido a evadir la apoptosis y elementos reguladores del crecimiento. Además, se ha detectado la expresión aumentada de AT1R en tejido de cáncer de próstata en comparación con los niveles de expresión en próstata humana normal.

10 [0352] Ahora se ha establecido bien que AT1R induce proliferación celular en una diversidad de modelos celulares, que incluyen células cancerosas humanas, activando diversas cascadas intracelulares de proteína quinasas asociadas habitualmente con estimulación con factor del crecimiento. Lo que es aún más importante, AT1R transactiva el EGFR en células de cáncer de próstata, conduciendo a activación de quinasa regulada extracelularmente (ERK), fosforilación de transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3). La transactivación mediada por AT1R de EGFR es particularmente pertinente para el cáncer debido a que la 15 amplificación de EGFR está frecuentemente asociada con progresión tumoral. De hecho ahora se están desarrollando estrategias eficaces anticancerosas usando anticuerpos monoclonales para el EGFR tales como Herceptin® (Genentech, Inc.).

20 [0353] Se ha centrado un interés reciente en el posible papel de fármacos antihipertensivos en la terapia anticancerosa. Por ejemplo, el uso de ACE en modelos de animales de experimentación indica un efecto protector de estos fármacos contra desarrollo del tumor. Además, Los y Candesartan que son ambos antagonistas de AT1R, se ha demostrado que reducen el crecimiento y la vascularización del tumor en modelos de xenoinjerto de células de cáncer de próstata humano. Además se ha detectado la regulación positiva de ACE en hipertrofia prostática benigna. PAX2 estaba regulada positivamente en regiones benignas de pacientes con PIN y cáncer de próstata. Por 25 lo tanto, es plausible que PAX2 sea un acontecimiento de inicio en la patobiología de cáncer de próstata y pueda ser una diana de quimioprevención viable para la prevención del desarrollo de cáncer de próstata.

30 [0354] La inhibición de la apoptosis es un factor fisiopatológico crítico que contribuye al desarrollo de cáncer de próstata. A pesar de avances significativos en los productos terapéuticos del cáncer se ha realizado poco progreso en el tratamiento de enfermedad avanzada. Dado que la carcinogénesis es una enfermedad de progresión multi-anual, multi-etapa, multi-ruta, la quimioprevención mediante el uso de fármacos u otros agentes para inhibir, retrasar o invertir este proceso se ha reconocido como un área muy prometedora de la investigación del cáncer. El tratamiento farmacológico exitoso para la quimioprevención de cáncer de próstata requiere el uso de productos terapéuticos con efectos específicos sobre células dianas mientras que se mantengan mínimos efectos clínicos 35 sobre el hospedador con el objetivo global de suprimir el desarrollo del cáncer. Por lo tanto, la comprensión de los mecanismos en la carcinogénesis de estadio temprano es crítica en la determinación de la eficacia de un tratamiento específico. La significación de la expresión aberrante de PAX2 y su anulación de apoptosis, con contribución posterior a la formación de tumor, sugiere que puede ser una diana adecuada para el tratamiento del cáncer de próstata. PAX2 estaba regulado por el AT1R en cáncer de próstata (Figura 26). En esto, la señalización desregulada 40 de RAS dio como resultado expresión del oncogén PAX2 aumentada y una disminución en la expresión del supresor tumoral DEFB1. Por lo tanto, el uso de antagonistas de AT1R disminuye la expresión de PAX2 y da como resultado muerte de células de cáncer de próstata aumentada mediante re-expresión de DEFB1 (Figura 27). Estos resultados ofrecen un hallazgo novedoso de que abordando la expresión de PAX2 mediante la ruta de señalización de renina-angiotensina, la ruta de AMP quinasa u otros procedimientos que implican la inactivación de la proteína PAX2 (es decir, vacunación con anticuerpos anti-PAX2) puede ser una diana viable para la prevención del cáncer (Tabla 7).

Tabla 7. Compuestos utilizados para inhibir la expresión de PAX2 para la quimioprevención

NOMBRE		Clase de fármaco
Fármaco 1	Losartán	Bloqueante del receptor de angiotensina de tipo 1
Fármaco 2	PD123319	Bloqueante del receptor de angiotensina de tipo 2
Fármaco 3	U0126	Inhibidor de MEK
Fármaco 4	PD98059	Inhibidor de MEK/ERK
Fármaco 5	AICAR	Inductor de AMP quinasa
	Diana	Función del fármaco
Fármaco A	Anticuerpos anti-PAX2	Vacuna de PAX2
Fármaco B	Angiotensinógeno	Inhibidor de la ruta renina-AngII
Fármaco C	Enzima conversora de angiotensina	Inhibidor de la ruta renina-AngII

9. Ejemplo 9: Nivel de expresión PAX2-DEFB1 como una herramienta de clasificación para tejido de próstata y predictor del desarrollo de cáncer de próstata

5 Materiales y procedimientos

[0355] *Análisis de QRT-PCR:* Se recogieron secciones de próstata de pacientes que se sometieron a prostatectomías radicales. Después de la examinación patológica se realizó microdissección de captura de láser para aislar áreas de tejido normal, proliferativo, neoplasia intraepitelial (PIN) y canceroso. Se realizó QRT-PCR como se ha descrito previamente para evaluar la expresión. Se usó la expresión de DEFB1 y PAX2 en cada región y GAPDH como un control interno.

[0356] *Recogida de sangre y aislamiento de ARN:* Para QRT-PCR se recogió sangre (2,5 ml) de cada individuo en un tubo para ARN de sangre PAXgene™ (QIAGEN) siguiendo el Protocolo del fabricante. Se mezcló sangre completa de forma exhaustiva con reactivo de estabilización PAXgene y se almacenó a temperatura ambiente durante 6 horas antes de la extracción de ARN. Después se extrajo el ARN total usando el kit de ARN de sangre PAXgene™ de acuerdo con las direcciones del fabricante (QIAGEN). Para eliminar el ADN genómico contaminante, las muestras de ARN total absorbidas a la columna de centrifugación del sistema de ARN de sangre PAXgene™ se incubaron con ADNasa I (QIAGEN) a 25 °C durante 20 min para eliminar el ADN genómico. El ARN total se eluyó, cuantificó y se realiza QRT-PCR como se ha mencionado previamente para comparar las proporciones de expresión de PAX2 y DEFB1.

Resultados

25 [0357] El análisis de QRT-PCR de tejido normal de LCM demostró que los pacientes con niveles de expresión relativa de DEFB1 superiores a 0,005 tienen una menor puntuación de Gleason en comparación con los que tienen niveles de expresión inferiores a 0,005 (Figura 28A). Si existe una relación inversa entre la expresión de DEFB1 y la puntuación de Gleason. Por el contrario, había una correlación positiva entre la expresión de PAX2 y la puntuación de Gleason en tejido maligno de próstata y PIN (Figura 28B).

30 [0358] Los niveles de expresión de PAX2 y DEFB1 en tejidos normales, PIN y cancerosos de pacientes separados se calcularon y compararon (Figura 29). En total, los niveles de expresión de PAX2 con respecto al control interno de GAPDH variaron entre 0 y 0,2 en tejido (benigno) normal, 0,2 y 0,3 en PIN y entre 0,3 y 0,5 en tejido (maligno) canceroso (Figura 30). Para DEFB1 había una relación inversa en comparación con PAX2. En este caso, los niveles 35 de expresión de DEFB1 con respecto al control interno de GAPDH variaron entre 0,06 y 0,005 en el tejido (benigno), normal 0,005 y 0,003 en PIN y entre 0,003 y 0,001 en tejido (maligno) canceroso. Por lo tanto se desvela una escala predictiva (PRD) que utiliza la proporción de expresión PAX2-DEFB1 como un pronosticador de tejido de próstata benigno, precanceroso (PIN) y maligno. Los tejidos con proporciones de PAX2-DEFB1 entre 0 y 39 basándose en la DPF representarán normal (patológicamente benigno). El tejido con una proporción de PAX2-DEFB1 entre 40 y 99 40 representarán PIN (pre-canceroso) basándose en la escala de DPF. Finalmente, el tejido con una proporción de PAX2-DEFB1 entre 100 y 500 serán maligno (cáncer de grado bajo alto).

Conclusión

45 [0359] Actualmente existe una necesidad crítica de biomarcadores predictivos para el desarrollo de cáncer de próstata. Se sabe que la aparición del cáncer de próstata tiene lugar mucho antes de que la enfermedad sea detectable mediante los procedimientos actuales de exploración tales como el ensayo de PSA o el examen digital rectal. Se piensa que un ensayo fiable que podría controlar la progresión y la aparición temprana de cáncer de próstata reduciría en gran medida la tasa de mortalidad mediante un tratamiento más eficaz de la enfermedad. En la 50 presente memoria se desvela un índice predictivo para permitir a los facultativos saber bastante antes el estado patológico de la próstata. El DPF mide la disminución en la proporción de la expresión de PAX2-DEFB1 asociada con progresión de enfermedad de próstata. Esta medida potente no puede predecir solamente la probabilidad de que un paciente desarrolle cáncer de próstata, sino que también puede precisar la aparición temprana de cáncer pre-maligno. Finalmente, esta herramienta puede permitir a los facultativos segregar qué pacientes tienen 55 enfermedad más agresiva de los que no la tienen.

[0360] La identificación de marcadores específicos de cáncer se ha utilizado para ayudar a identificar células tumorales circulantes (CTC). También existen pruebas emergentes que demuestran que la detección de células tumorales diseminadas en sangre periférica puede proporcionar datos clínicamente importantes para estadificación 60 del tumor, pronóstico e identificación de marcadores sustitutos para la evaluación temprana de la eficacia de la terapia adyuvante. Además, comparando el perfil de expresión génica de todas las células circulantes se puede examinar la expresión de los genes DEFB1 y PAX2 que desempeñan un papel en la "inmunovigilancia" y "supervivencia de cáncer", respectivamente, como un pronosticador para la detección temprana del cáncer de próstata.

10. Ejemplo 10: Análisis funcional del péptido de defensa del hospedador defensina beta humana 1: nueva percepción de su potencial papel en cáncer

Materiales y procedimientos

5

[0361] *Cultivo celular:* las líneas celulares de cáncer de próstata se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA). Se cultivaron células DU145 en medio de DMEM, PC3 y PC3/AR+ se cultivaron en medio F12 y LNCaP se cultivaron en medio RPMI (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY). El medio de cultivo para las tres líneas se complementó con suero fetal bovino a 10% (v/v) (Life Technologies). El cultivo primario de hPrEC se obtuvo de Cambrex Bio Science, Inc. (Walkersville, MD) y las células se cultivaron en medio basal de epitelio de próstata. Todas las células se mantuvieron a 37 °C y CO₂ a 5%.

[0362] *Muestras tisulares y microdissección con captura de láser:* se obtuvieron tejidos de próstata de pacientes que proporcionaron un consentimiento informado antes de someterse a prostatectomía radical. Se adquirieron muestras 15 a través del banco de tumor del Centro de Cáncer Hollings de acuerdo con un protocolo aprobado por una Comisión de revisión institucional. Esto incluyó directrices para el procesamiento, sección, caracterización histológica, purificación de ARN y amplificación por PCR de las muestras. Las muestras de próstata recibidas de los cirujanos y patólogos se congelaron inmediatamente en compuesto OCT. Cada bloque de OCT se cortó para producir secciones seriadas que se tiñeron y examinaron. Se identificaron las áreas que contenían células benignas, 20 neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y cáncer y se usaron para guiar la selección de los inventores de regiones de porta-objetos no teñidos usando el sistema Arcturus PixCell II (Sunnyvale, CA). Los tapones que contenían material capturado se expusieron a 20 µl de lisado del kit de aislamiento de ARN Arcturus Pico Pure y se procesaron inmediatamente. La cantidad y calidad del ARN se evaluó usando conjuntos de cebadores que producen amplicones 5'. Los conjuntos incluyen aquellos para la proteína ribosómica L32 (el amplicón 3' y el amplicón 5' están alejados 25 298 bases), para la glucosa fosfato isomerasa (alejada 391 bases) y para la glucosa fosfato isomerasa (alejada 842 bases). Las proporciones de 0,95 a 0,80 se obtuvieron de forma rutinaria para estos conjuntos de cebador usando muestras de una diversidad de tejidos preparados. Muestras adicionales de tumor y normales se diseccionaron macroscópicamente por patólogos, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se evaluaron para la expresión de hBD-1 y cMYC.

30

[0363] *Clonación del gen hBD-1:* Se generó ADNc de hBD-1 se a partir de ARN mediante PCR de transcripción inversa usando cebadores generados a partir de la secuencia publicada de hBD-1 (número de acceso U50930) (Ganz, 2004). Los cebadores de PCR se diseñaron para contener sitios de restricción Clal y Kpnl. Los productos de PCR de hBD-1 se sometieron a digestión de restricción con Clal y Kpnl y se ligaron en un vector de clonación TA. 35 Después, el vector TA/hBD1 se introdujo mediante transfección en la cepa XL-1 Blue de *E. coli* mediante choque térmico y se seleccionaron y expandieron clones individuales. Los plásmidos se aislaron mediante Midiprep de ADN de cultivo celular (Qiagen, Valencia, CA) y la integridad de secuencia se verificó mediante secuenciación automatizada. Después, el fragmento del gen hBD-1 se ligó en el pTRE2 digerido con Clal y Kpnl, que sirvió como un vector intermedio con fines de orientación. La construcción pTRE2/hBD-1 se digirió con Apal y Kpnl para escindir 40 el inserto de hBD-1. El inserto se ligó en el vector pIND del sistema de expresión inducible por ecdisona (Invitrogen, Carlsbad, CA) también se digirió dos veces con Apal y Kpnl. La construcción se introdujo mediante transfección en *E. coli* y se seleccionaron y expandieron clones individuales. Los plásmidos se aislaron y se verificó de nuevo la integridad de secuencia de pIND/hBD-1 mediante secuenciación automatizada.

45 [0364] *Transfección:* Se sembraron células (1×10^6) sobre placas de Petri de 100 mm y se cultivaron durante una noche. A continuación, las células se introdujeron mediante co-transfección usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) con 1 µg de plásmido pvgRXR, que expresa el receptor de ecdisona heterodimérico y 1 µg de la construcción de vector pIND/hBD-1 o el vector de control pIND/β-galactosidasa (β-gal) en medio Opti-MEM (Life Technologies, Inc.). Se determinó la eficacia de transfección induciendo la expresión de β-gal con Ponasterona A (PonA) y tinción de 50 células con un kit de detección de β-galactosidasa (Invitrogen). La evaluación de la eficacia de transfección mediante el recuento de colonias que se tiñeron en positivo (azul) demostró que 60-85% de las células expresó β-galactosidasa para las líneas celulares.

55 [0365] *Inmunocitoquímica:* para verificar la expresión de proteína hBD-1 se sembraron células DU145 y hPrEC en portaobjetos de cultivo de 2 cámaras (BD Falcon, Estados Unidos) con $1,5-2 \times 10^4$ células por cámara. Las células DU145 transfectadas con pvgRXR en solitario (control) o con el plásmido hBD-1 se indujeron durante 18 horas con medio que contenía Pon A 10 µM, mientras que las células no transfectadas recibieron medio de cultivo fresco. Despues de la inducción, las células se lavaron en PBS 1 x y se fijaron durante 1 h a temperatura ambiente con paraformaldehído a 4%. Despues, las células se lavaron seis veces con PBS 1 x y se bloquearon en PBS 1 x 60 complementado con BSA a 2%, suero normal de cabra a 0,8% (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) y Tritón-X 100 a 0,4% durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, las células se incubaron durante una noche en anticuerpo polyclonal primario de conejo anti-BD-I humano (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ) diluido 1:1000 en solución de bloqueo. Despues de esto, las células se lavaron seis veces con solución de bloqueo y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo (H + L) Alexa Fluor 488

con una dilución de 1:1000 en solución de bloqueo. Después de lavar las células con solución de bloqueo seis veces se montaron cubre portaobjetos con Gel Mount (Biomedica, Foster City, CA). Finalmente, las células se visualizaron bajo contraste de interferencia diferencial (DIC) y con excitación con láser a 488 nm. La señal fluorescente se analizó mediante microscopía confocal (Zeiss LSM 5 Pascal) usando una lente de aceite DIC 63x con un módulo de exploración de láser Vario 2 RGB. Las imágenes digitales se exportaron a Software Photoshop CS (Adobe Systems) para procesamiento de imágenes y presentación en copia impresa.

[0366] Aislamiento de ARN y RT-PCR cuantitativa: se realizó QRT-PCR como se ha descrito previamente (Gibson et al.,) 2007. En resumen, el ARN total (0,5 µg por reacción) de secciones titulares se sometió a transcripción inversa hasta ADNc usando cebadores aleatorios (Promega). Se realizó QRT-PCR de dos etapas en ADNc generado usando la transcriptasa inversa MultiScribe del sistema de transcripción inversa TaqMan y la mezcla madre de PCR SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los pares de cebadores para hBD-1 y c-MYC se generaron a partir de las secuencias publicadas (Tabla 7). Se realizaron cuarenta ciclos de PCR en condiciones convencionales usando una temperatura de hibridación de 56,4 °C para hBD-1 y c-MYC y 55 °C para PAX2. Además, la β-actina (Tabla 7) se amplificó como un gen constitutivo para normalizar el contenido inicial de ADNc total. La expresión génica en muestras de próstata benigna se calculó como la proporción de expresión en comparación con β-actina. Los niveles de la expresión de hBD-1 en tejido de próstata maligno, cultivo primario de próstata hPREC y líneas celulares de cáncer de próstata antes y después de la inducción se calcularon con respecto al nivel promedio de la expresión de hBD-1 en células hPrEC. Como un control negativo se realizaron también reacciones de QRT-PCR sin molde de ADNc. Todas las reacciones se procesaron un mínimo de tres veces.

[0367] Ensayo de viabilidad celular de MTT: para examinar los efectos de hBD-1 sobre el crecimiento celular se realizó el ensayo metabólico de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio (MTT). Las células DU145, LNCap, PC3 y PC3/AR+ introducidas mediante co-transfección con el plásmido pvgRXR y la construcción pIND/hBD-1 o el plásmido de control pvgRXR se sembraron en una placa de 96 pocillos con 1-5 x 10³ células por pocillo. Veinticuatro horas después de la siembra se añadió medio del cultivo fresco que contenía Pon A 10 µM diariamente para inducir la expresión de hBD-1 durante 24, 48 y 72 horas, después de lo cual se realizó el ensayo de MTT de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega). Las reacciones se realizaron tres veces por triplicado.

[0368] Análisis de la integridad de membrana: Se realizó la tinción doble con naranja de acridina (AO)/bromuro de etidio (EtBr) para identificar los cambios en la integridad de la membrana celular así como de las células apoptóticas tiñendo la cromatina condensada. El AO tiñe células viables y células apoptóticas tempranas, mientras que EtBr tiñe células apoptóticas de estadio tardío que tienen membranas comprometidas. En resumen, las células PC3, DU145 y LNCaP se sembraron en portaobjetos de cultivo de 2 cámaras (BD Falcon). Las células transfectadas con plásmido vacío o plásmido hBD-1 se indujeron durante 24 o 48 h con medio que contenía Pon A 10 µM, mientras que las células de control recibieron medio de cultivo fresco en cada punto de tiempo. Después de la inducción, las células se lavaron una con PBS y se tiñeron con 2 ml de una mezcla (1:1) de solución de AO (Sigma, St. Louis, MO) y EtBr (Promega) (5 µg/ml) durante 5 min y se lavaron de nuevo con PBS.

[0369] La fluorescencia se visualizó con un Microscopio Confocal de Exploración con Láser Zeiss LSM 5 Pascal Vario 2 (Carl Zeiss). La rueda de color de excitación contiene bloques de filtro BS505-530 (verde) y LP560 (rojo) que permitió la separación de luz verde emitida de AO en el canal verde y luz roja de EtBr en el canal rojo. La salida de potencia del láser y los ajustes de control de la ganancia en cada experimento individual fueron idénticas entre las células de control e inducidas con hBD-1. La excitación se proporcionó con un láser de gas mixto Kr/Ar con longitudes de onda de 543 nm para AO y 488 nm para EtBr. Los portaobjetos se analizaron con aumento de 40 x y las imágenes digitales se almacenaron como archivos TIFF no comprimidos y se exportaron a software Photoshop CS (Adobe systems) para procesamiento de imágenes y presentación en copia impresa.

50

Tabla 7. Secuencias de cebadores de QRT-PCR

	Con sentido (5' -3')	Antisentido (5' -3')
β-actina	CCTGGCACCCAGCACAAT (SEC ID Nº 30)	GCCGATCCACACGGAGTACT (SEC ID Nº 32)
hBD-1	TCAGCAGTGGAGGGCAATG (SEC ID Nº 60)	CCTCTGTAAACAGGTGCCTTGAAT (SEC ID Nº 61)
cMYC	ACAGCAAACCTCCTCACAGCC (SEC ID Nº 62)	TGGAGACGTGGCACCTCTTG (SEC ID Nº 63)
Secuencias de nucleótidos de cebadores usados para amplificar hBD-1, cMyc, PAX2 y β-actina		

[0370] Citometría de flujo: Se cultivaron células PC3 y DU145 transfectadas con el sistema de expresión de hBD-1 en placas de 60 mm y se indujeron durante 12, 24 y 48 h con Pon A 10 µM. Después de cada período de incubación, el medio se recogió de las placas (para conservar cualquier célula desprendida) y se combinó con PBS usado para lavar las placas. Las células unidas restantes se recogieron mediante tripsinización y se combinaron con las células desprendidas y PBS. Después, las células se sedimentaron a 4 °C (500 x g) durante 5 min, se lavaron dos veces en PBS y se resuspendieron en 100 µl de tampón de unión de anexina 1x (Hepes/NaOH 0,1 M a pH 7,4, NaCl 1,4 M,

CaCl₂ 25 mM) que contenía 5 µl de anexina V-FITC y 5 µl de PI. Las células se incubaron a TA durante 15 min en la oscuridad, después se diluyeron con 400 µl de tampón de unión de anexina 1x y se analizaron mediante FACscan (Becton Dickinson, San José, CA). Todas las reacciones se realizaron tres veces.

5 [0371] **Detección de caspasa:** La detección de la actividad de caspasa en las líneas celulares de cáncer de próstata se realizó usando un kit de detección de caspasa de carboxifluoresceína APO LOGIX™ (Cell Technology, Mountain View, CA). Las caspasas activas se detectaron mediante el uso del péptido fluorometil cetona marcado con carboxifluoresceína (FAMVAD-FMK) que se une irreversiblemente a caspasas activas. En resumen, las células DU145 y LNCaP ($1,5\text{-}3 \times 10^5$) que contenían el sistema de expresión de hBD-1 se sembraron en placas de fondo de vidrio de 35 mm (Matek, Ashland, MA) y se trataron durante 24 h solamente con medio o con medio que contenía Pon A como se ha descrito previamente. A continuación, 10 µl de una dilución de trabajo 30 x de FAM-VAD-FMK se añadieron a 300 µl de medio y se añadieron a cada placa de 35 mm. Después, las células se incubaron durante 1 h a 37 °C con CO₂ a 5%. El medio se aspiró y las células se lavaron dos veces con 2 ml de un tampón de lavado de dilución de trabajo 1 x. Las células se visualizaron con contraste de interferencia diferencial (DIC) o con excitación de láser a 488 nm. La señal fluorescente se analizó mediante microscopía confocal como se ha descrito anteriormente.

10 [0372] **Silenciamiento con ARNip de PAX2:** Se realizó la anulación con ARNip y verificación como se ha descrito previamente (Gibson *et al.*, 2007). En resumen, un grupo de cuatro ARNip complementarios dirigidos a ARNm de PAX2 humano (Nº de acceso NM 003989.1) se sintetizaron (Dharmacon Research, Lafayette, CO, Estados Unidos). 20 Además, un segundo grupo de cuatro ARNip no específico se usó como un control negativo para ensayar la especificidad de ARNip de PAX2. Las moléculas de ARNip se recubrieron con reactivo de transfección CodeBreaker (Promega, Inc.) de acuerdo con las direcciones del fabricante antes del tratamiento.

25 [0373] **Análisis estadístico:** Se realizó el análisis estadístico usando el ensayo t de Student para valores desapareados. Se determinaron los valores de P mediante un cálculo de dos lados y se consideró un valor P inferior a 0,05 estadísticamente significativo. Las diferencias estadísticas se indican mediante asteriscos.

Resultados

30 [0374] **Expresión de hBD-1 en tejido de próstata:** 82% de las secciones titulares congeladas de cáncer de próstata analizadas mostraron poca o ninguna expresión de hBD-1 (Donald *et al.*, 2003). Para comparar los niveles de expresión de hBD-1, se realizó análisis de QRTPCR en tejido de próstata normal obtenido mediante disección macroscópica o LCM de tejido de próstata normal adyacente a regiones malignas que se eligieron aleatoriamente. En este caso se detectó hBD-1 en todas las muestras clínicas normales diseccionadas macroscópicamente con un 35 intervalo de expresión que representa aproximadamente una diferencia de 6,6 veces en los niveles de expresión (Fig. 31A). Las muestras tisulares normales capturadas con LCM expresaron hBD-1 a niveles en un intervalo que representa una diferencia de 32 veces en la expresión (Fig. 31B). El emparejamiento de los números de muestra con los correspondientes perfiles de paciente mostró que en la mayoría de los casos, el nivel de expresión de hBD-1 era mayor en muestras de pacientes con una puntuación de Gleason de 6 que en muestras de pacientes con una 40 puntuación de Gleason de 7. Además, una comparación de los niveles de expresión de hBD-1 en tejido obtenido mediante disección macroscópica y LCM del mismo paciente, Nº 1343, demostró una diferencia de 854 veces en la expresión entre las dos técnicas de aislamiento. Por lo tanto, estos resultados indican que LCM proporciona una técnica más sensible para evaluar la expresión de hBD-1 en tejido de próstata.

45 [0375] **Expresión de hBD-1 en líneas celulares de próstata:** Para verificar la regulación positiva de hBD-1 en las líneas celulares de cáncer de próstata después de la transfección con el sistema de expresión de hBD-1, se realizó QRTPCR. Además se realizaron también controles negativos sin molde y los productos de amplificación se verificaron mediante electroforesis en gel. En este caso, la expresión de hBD-1 era significativamente menor en las líneas celulares de cáncer de próstata en comparación con las células hPrEC. Después de un período de inducción 50 de 24 h, los niveles de expresión relativa de hBD-1 aumentaron significativamente en DU145, PC3 y LNCaP en comparación con las líneas celulares antes de la inducción con hBD-1 (Fig. 32A).

55 [0376] A continuación la expresión de proteína de hBD-1 se verificó en células DU145 transfectadas con el sistema de expresión de hBD-1 después de la inducción con Pon A mediante inmunocitoquímica. Como un control positivo se examinaron también las células epiteliales de próstata hPrEC que expresan hBD-1. Las células se tiñeron con un anticuerpo primario contra hBD-1 y se controló la expresión de proteína basándose en la fluorescencia verde del anticuerpo secundario (Fig. 32B). El análisis de las células bajo DIC verifica la presencia de células hPrEC y células DU145 inducidas para la expresión de hBD-1 a las 18 horas. La excitación con el láser confocal a 488 nm produjo fluorescencia verde mostrada indicando la presencia de proteína hBD-1 en hPrEC como un control positivo. Sin embargo, no había fluorescencia verde detectable en células de DU145 de control y células DU145 inducidas con plásmido vacío demostrando que no había expresión de hBD-1. El análisis confocal de células DU145 inducidas para expresión de hBD-1 mostró fluorescencia verde indicando la presencia de proteína hBD-1 después de la inducción con Pon A.

[0377] La Expresión de los resultados hBD-1 en cuanto a la viabilidad celular disminuida: se realizó ensayo MTT para valorar el efecto de la expresión de hBD-1 sobre la viabilidad celular relativa en líneas de células cancerosas de próstata DU145, PC3, PC3/AR+ y LNCaP. El análisis MTT con el vector vacío no mostró cambio estadístico significativo en la viabilidad celular. Veinticuatro horas después de inducción con hBD-1, la viabilidad celular relativa 5 fue de 72% en las células DU145 y de 56% en las células PC3, y después de 48 h la viabilidad celular se redujo a 49% en las células DU145 y a 37% en células PC3 (Fig. 33A). Después de 72 h de inducción con hBD-1, la viabilidad celular relativa disminuyó adicionalmente a 44% en células DU 145 y 29% en células PC3. De manera inversa, no hubo efecto significativo sobre la viabilidad de las células LNCaP. Para evaluar si la resistencia a la citotoxicidad de hBD-1 observada en LNCaP era debida a la presencia de receptor de andrógenos (RA), se examinó 10 la citotoxicidad de hBD-1 en células PC3 con la expresión ectópica de RA (PC3/AR+). En este caso, no hubo diferencia entre células PC3/AR+ y células PC3. Por lo tanto, los datos indican que hBD-1 es específicamente citotóxico contra células cancerosas de próstata de fase tardía.

[0378] Para determinar si los efectos de hBD-1 sobre PC3 y DU145 eran citoestáticos o citotóxicos, se realizó 15 análisis FACS para medir la muerte celular. En condiciones de crecimiento normales, más de 90% de cultivos PC3 y DU145 fueron viables y no apoptóticos (cuadrante izquierda inferior) y no se tiñeron con anexina V o PI (Fig. 4). Después de inducir la expresión de hBD-1 en células PC3, la cantidad de células que experimentaban apoptosis precoz y apoptosis/necrosis tardía (cuadrantes izquierdo inferior y superior, respectivamente) fue de un total de 10% a las 12 h, 20% a las 24 h y 44% a las 48 h. Para las células DU145, la cantidad de células que experimentaban 20 apoptosis precoz y apoptosis/necrosis tardía fue de un total de 12% después de 12 h, 34% a las 24 h y 59% después de 48 h de inducción. No se observó aumento en la apoptosis en las células que contenían plásmido vacío después de inducción con Pon A. Estudios de captación de anexina V y yoduro de propidio demostraron que hBD-1 tenía actividad citotóxica contra células cancerosas de próstata DU145 y PC3 y los resultados indican apoptosis como un mecanismo de muerte celular.

[0379] hBD-1 produce alteraciones en la integridad de la membrana y activación de caspasa: Se investigó si la muerte celular observada en células cancerosas de próstata después de inducción con hBD-1 es apoptosis mediada por caspasa. Para entender mejor los mecanismos celulares implicados en la expresión de hBD-1, se realizaron análisis microscópicos de láser confocales (Fig. 5) en células DU145 y LNCaP inducidas para la expresión de hBD-30 1. La activación pan-caspasa se controló basándose en la unión y escisión de FAM-VAD-FMK de fluorescencia verde contra caspasas en células que activamente experimentaban apoptosis. El análisis de células con DIC mostró la presencia de células control DU145 (Fig. 5A) y LNCaP (Fig. 5E) viables a las 0 horas. La excitación mediante láser confocal a 488 nm no produjo tinción verde detectable lo que indica que no había actividad caspasa en células DU145 (Fig. 5B) o LNCaP (Fig. 5F) control. Después de la inducción durante 24 h, las células DU145 (Fig. 5C) y 35 LNCaP (Fig. 5G) fueron de nuevo visibles con DIC. El análisis confocal con fluorescencia reveló tinción verde en células DU145 (Fig. 5D) indicando una actividad pan-caspasa después de la inducción de la expresión de hBD-1. Sin embargo no hubo tinción verde en células LNCaP (Fig. 5H) inducidas para la expresión de hBD-1. Por lo tanto, la muerte celular observada después de inducción de hBD-1 es apoptosis mediada por caspasa.

[0380] El mecanismo propuesto de actividad antimicrobiana de péptidos de defensina es la alteración de la membrana microbiana debido a la formación de poros (Papo y Shai, 2005). Para determinar si la expresión de hBD-1 modificaba la integridad de membrana modificada, la captación de EtBr se examinó mediante análisis confocal. Células intactas se tiñeron de verde debido a AO que es permeable a membrana, mientras que únicamente células con membranas plasmáticas comprometidas se tiñeron de rojo debido a la incorporación de EtBr impermeable a la 45 membrana. Las células de control DU145 y PC3 se tiñeron positivamente con AO y emitieron color verde, pero no se tiñeron con EtBr. Sin embargo, la inducción de hBD-1 tanto en células DU 145 como PC3 dio como resultado la acumulación de EtBr en el citoplasma a las 24 h como se indica mediante la tinción de rojo. A las 48 h, DU145 y PC3 poseían núcleos condensados y aparecían amarillos debido a la colocalización de tinción verde y roja procedente de AO y de EtBr, respectivamente. De manera inversa, no hubo modificaciones observables con respecto a la 50 integridad de membrana en las células LNCaP después de 48 h de inducción como se indica mediante fluorescencia verde positiva con AO, pero carecían de fluorescencia EtBr roja. Este hallazgo indica que las alteraciones con respecto a la integridad y permeabilización de membrana en respuesta a la expresión de hBD- 1 difieren entre células cancerosas de próstata de fase precoz y tardía.

[0381] Comparación de niveles de expresión de hBD-1 y cMYC: Se realizó QRT-PCR sobre secciones de tejido de próstata LCM procedentes de tres pacientes (Fig. 34). En el paciente N° 1457, la expresión de hBD-1 mostró un aumento de 2,7 veces de normal a PIN, una disminución de 3,5 veces de PIN a tumor y una disminución de 9,3 veces de normal a tumor (Fig. 34A). Del mismo modo, la expresión de cMYC siguió un modelo de expresión similar en el paciente N° 1457 en el que la expresión disminuyó 1,7 veces de normal a PIN, 1,7 veces de PIN a tumoral y 60 2,8 veces de normal a tumoral (Fig. 34B). Además, hubo disminución estadísticamente significativa en la expresión de cMYC en los otros dos pacientes. El paciente N° 1569 tuvo una disminución 2,3 veces de normal a PIN mientras que en el paciente N° 1586 hubo una disminución de 1,8 veces de normal a PIN, una disminución 4,3 veces de PIN a tumoral y una disminución de 7,9 veces de normal a tumoral.

[0382] Inducción de la expresión de hBD-1 después de inhibición con PAX2: Para examinar adicionalmente la función de PAX2 en la regulación de la expresión de hBD-1, se utilizó ARNip para inactivar la expresión de PAX2 y se realizó QRT-PCR para controlar la expresión de hBD-1. El tratamiento de células hPrEC con ARNip de PAX2 no mostró efectos sobre la expresión de hBD-1 (Fig. 35). Sin embargo, la disminución de la expresión de PAX2 dio como resultado un aumento de 42 veces en LNCaP, un aumento de 37 veces en PC3 y un aumento de 1026 veces en la expresión de DU145 de hBD-1 en comparación con células no tratadas. Como control negativo, las células se trataron con ARNip no específico que no tenía efectos significativos sobre la expresión de hBD-1.

11. Ejemplo 11: La inhibición de la expresión de PAX2 da como resultado rutas de muerte celular alternativas en células de cáncer de próstata diferentes en estado de p53

Materiales y procedimientos

[0383] Líneas celulares: Se obtuvieron las líneas celulares cancerosas PC3, DU145 y LNCaP, todas ellas difiriendo en el estado mutacional p53 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Rockville, MD, Estados Unidos). Se cultivaron células PC3 en medio F-12, DU145 en DMEM y LNCaP en RPMI todo complementado con suero fetal bovino a 10% (v/v). La línea celular epitelial de próstata HPrEC se obtuvo a partir de Cambrex Bio Science, Inc., (Walkersville, MD) y se cultivaron en medio basal de epitelio prostático. Las células se conservaron a 37 °C en CO₂ a 5%.

[0384] Silenciamiento del ARNip de PAX2: Para conseguir un silenciamiento génico eficaz, se sintetizó un conjunto de cuatro ribonucleótidos de interferencia cortos complementarios (ARNip) que dirigen el ARNm de PAX2 (Nº de acceso NM_003989.1) (Dharmacon Research, Lafayette, CO, Estados Unidos). Para garantizar la especificidad, los ARNip se diseñaron para regiones diana únicas hacia la secuencia PAX2 para impedir una disminución de la expresión posterior de otros miembros de la familia PAX. Además, se usó un segundo conjunto de cuatro ARNip como un control interno para someter a ensayo la especificidad de los ARNip de PAX2. Dos de las secuencias que se sintetizaron dirigieron el ARNm de GL2 luciferasa (Nº de acceso X65324), y los otros dos dirigieron un ARNm de PAX2 distorsionado (Tabla 9).

[0385] Análisis de Western: En breve, se recogieron células por tripsinización y se lavaron dos veces con PBS. El tampón de lisis se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Sigma) y después se añadió a las células. Después de un periodo de incubación de 15 minutos a 4 °C en un agitador orbital, se recogieron los lisados celulares y se centrifugó durante 10 minutos a 12.000 g para sedimentar los desechos celulares. El sobrenadante que contenía la proteína se recogió después y se cuantificó. Despues, se cargaron 25 µg de extracto de proteína sobre un gradiente SDS-PAGE a 8-16% (Novex). Después de electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF, y después se bloquearon con leche deshidratada no grasa a 5% en TTBS (Tween a 0,05% y Tris-Cl 100 mM) durante 1 h. Después de las transferencias se sondaron con anticuerpo primario de conejo anti-PAX2 (Zymed, San Francisco, CA) a una dilución 1:1000. Después del lavado, las membranas se incubaron con anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (dilución 1:5000; Sigma), y la detección de señal se visualizó usando reactivos quimioluminiscentes (Pierce) sobre un Alpha Innotech Fluorchem 8900. Como control, las transferencias se separaron y volvieron a sondarse con anticuerpo primario de ratón anti-β-actina (1:5000; Sigma-Aldrich) y anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con HRP (1:5000; Sigma-Aldrich) y de nuevo se visualizó la detección de señal.

Tabla 8. Mutación del gen p53 en líneas celulares de cáncer de próstata

Línea celular	Cambio de nucleótidos	Cambio de aminoácidos	Estado génico	Referencia
DU 145	CCT-CTT	Pro-Leu	Ganancia/pérdida de función	Tepper <i>et al.</i> 2005; Bodhoven <i>et al.</i> 2003
	GTT-TTT	Val-Phe		
PC3	Delecionado a C, GCC-GC	Cambio de fase	Sin actividad	Isaacs <i>et al.</i> 1991
LNCaP	Sin delección, tipo silvestre	-	Función normal	Carroll <i>et al.</i> 1993

Tabla 9. Secuencias de ARNip de PAX2		
Secuencia	Sentido (5'-3')	Antisentido (5'-3')
A	GAAGUCAAGUCGAGUCUAUUU (SEC ID Nº: X)	AUAGACUCGACUUGACUUCUU (SEC ID Nº: X)
B	GAGGAAACGUGAUGAAGAUUU (SEC ID Nº: X)	AUCUUCAUCACGUUUCCUCUU (SEC ID Nº: X)
C	GGACAAGAUUGCUGAAUACUU (SEC ID Nº: X)	GUAUUCAGCAAUCUUGUCCUU (SEC ID Nº: X)
D	CAUCAGAGCA-CAUAAAUCUU (SEC ID Nº: X)	GAUUUGAUGUGCUCUGAUGUU (SEC ID Nº: X)

[0386] *Microscopía de contraste de fases:* Se analizó el efecto de la disminución de PAX2 en el número de células por microscopía de contraste de fase. En este caso, se sembraron $1\text{-}2 \times 10^4$ células durante una noche sobre placas de cultivo de seis pocillos (BD Falcon, Estados Unidos). Despues las células se trataron solo con medio, ARNip no específico como control negativo o ARNip de PAX2 y se dejó incubar durante 6 días. Despues las células se observaron con un microscopio invertido Zeiss IM 35 (Carl Zeiss, Alemania). Se obtuvieron fotografías de contraste de fase de un campo de células usando la cámara SPOT Insight Mosaic 4.2 camera (Diagnostic Instruments, Estados Unidos).

10 [0387] *Ensayo de citotoxicidad MTT:* Se diluyeron suspensiones de células DU145, PC3 y LNCaP y se sembraron sobre una placa de 96 pocillos a $1\text{-}5 \times 10^3$ células por pocillo. A continuación las células se transfectaron, de acuerdo con el protocolo del fabricante (Promega), con 5 pg/célula del conjunto de ARNip de PAX2, conjunto de ARNip control o solo reactivo de transfección Codebreaker. Se dejó que todas las células creciesen durante 2, 4 o 6 días 15 después del tratamiento. Despues se determinó la viabilidad celular midiendo la conversión de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolio, MTT (Promega) a un producto de formazán coloreado. La absorbancia se leyó a 540 nm sobre un espectrofotómetro de barrido multipocillo.

[0388] *Detección pan-caspasa:* La detección de la actividad caspasa en las líneas celulares de cáncer de próstata se realizó usando el kit de detección de Caspasa APO LOGIX™ con Carboxifluoresceína (Cell Technology, Mountain View, CA). Se detectaron caspasas activas con un inhibidor FAMVAD-FMK que se unía de manera irreversible a caspasas activas. Brevemente, $1\text{-}2 \times 10^4$ células se sembraron en placas sobre discos de micropocillos de fondo de vidrio de 35 mm (Matek, Ashland, MA) y se trataron solo con medio o con ARNip de PAX2 como se ha descrito previamente. A continuación, se añadió a cada disco de 35 mm 300 µl de fluorometilcetona peptídica marcada con carboxifluoresceína (FAM-VAD-FMK) y se incubó durante 1 h a 37 °C con CO₂ a 5%. Finalmente, las células se lavaron dos veces con 2 ml de tampón de lavado, y se observaron con un contraste de interferencia diferencial (DIC) o con excitación láser a 488 nm. La señal fluorescente se analizó usando un microscopio confocal Zeiss LSM 5 Pascal con un Módulo de Barrido por Láser Vario 2 RGB.

[0389] *RT-PCR cuantitativa en tiempo real:* Para verificar cambios en la expresión génica después de disminución 30 de la expresión de PAX2 en líneas celulares PC3, DU145 y LNCaP, se realizó RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Se recogieron aproximadamente 1×10^6 células por tripsinización y las células se aclararon en PBS. Despues las células se lisaron y se aisló ARN total por centrifugación a través de columnas de centrifugación usando el Sistema de Aislamiento de ARN Total SV (Pro-mega). Se generó ADNc (0,5 µg por reacción) por transcripción inversa mediante el cebador Oligo (dT) 15 (Promega) y enzima Transcriptasa Inversa II AMV (500 U por reacción; Promega) 35 para la síntesis de la primera cadena y ADN Polimerasa Tfl para la síntesis de la segunda cadena (500 U por reacción; Promega) siguiendo el protocolo del fabricante. Típicamente, se usaron 50 pg de cada ADNc por PCR resultante. Se realizaron dos etapas de QRT-PCR en ADNc generado usando la Transcriptasa Inversa MultiScribe del Sistema de Transcripción Inversa TaqMan y la Mezcla Maestra de PCR SYBR Green (PE Biosystems). Se generaron los pares de cebadores para BAX, BID, BCL-2, AKT y BAD a partir de las secuencias publicadas (Tabla 40 10). Las reacciones se realizaron en una Placa de Reacción de 96 pocillos MicroAmp Optical (PE Biosystems). Se realizaron cuarenta ciclos de PCR en condiciones normales usando una temperatura de hibridación de 60 °C. La cuantificación se determinó por el número de ciclo en el que comenzó una amplificación exponencial (valor umbral) y se realizó el promedio a partir de los valores obtenidos de las repeticiones por triplicado. Hubo una relación inversa entre el nivel de mensaje y el valor umbral. Además, se usó GAPDH como un gen constitutivo para normalizar el 45 contenido inicial de ADNc total. Se calculó la expresión relativa como la proporción entre cada uno de los genes y GAPDH. Todas las reacciones se realizaron por triplicado.

Tabla 10. Cebadores cuantitativos de RT-PCR

	Sentido (5'-3')	Antisentido (5'-3')
GAPDH	CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA (SEC ID Nº: 16)	TCTAGACGGCAGGTCAAGGTCAGGTCAACC (SEC ID Nº: 20)
BAD	CTCAGGCCTATGCAAAAGAGGA (SEC ID Nº: 17)	GCCCTCCCTCCAAAGGAGAC (SEC ID Nº: 21)
BID	AACCTACGCCACCTACGTGAGGAG (SEC ID Nº: 18)	CGTTCACT CCAT CCC ATTT CT G (SEC ID Nº: 22)
BAX	GACACCTGAGCTGACCTTGG (SEC ID Nº: 19)	GAGGAAGTCCAGTGTCCAGC (SEC ID Nº: 23)
BCL-2	TATGATAACCGGGAGATCGTGATC (SEC ID Nº: 65)	GTGCAGATGCCGGTTCAGGTACTC (SEC ID Nº: 66)
AKT	TCAGCCCTGGACTACCTGCA (SEC ID Nº: 67)	GAGGTCCCGGTACACCACGT (SEC ID Nº: 68)

[0390] **Ensayo de permeabilidad de membrana:** Se realizó tinción dual con naranja de acridina (AO)/bromuro de etidio (EtBr) para identificar cambios en la integridad de la membrana celular, así como células apoptóticas tiñendo la cromatina condensada. Las células viables teñidas con AO, así como células apoptóticas tempranas, mientras que las células apoptóticas en fase tardía se teñían con EtBr que tenían la integridad de membrana comprometida. Brevemente, se sembraron células PC3 y LNCaP en portaobjetos de cultivo con dos cámaras (BD Falcon) y las células se transfecaron con ARNip de PAX2, ARNip no específico o solo con medio. Después del tratamiento, las células se lavaron una vez con PBS y se tiñeron con 2 ml de una mezcla de solución de AO (1:1) (Sigma, St. Louis, MO) y EtBr (Promega) (5 µg/ml) durante 5 min. Después de la tinción, las células se lavaron de nuevo con PBS. La fluorescencia se observó mediante un Microscopio Confocal de Barrido Láser Zeiss LSM 5 Pascal Vario 2 (Carl Zeiss). La rueda de color de excitación contenía bloques de filtro BS505-530 (verde) y LP560 (rojo) lo que permitió la separación de luz verde emitida de AO en el canal verde y luz roja de EtBr en el canal rojo. En cada experimento individual los ajustes de control de ganancia y rendimiento de intensidad láser fueron idénticos entre las células tratadas con control y ARNip de PAX2. La excitación se proporcionó mediante un láser gaseoso mixto de Kr/Ar a longitudes de onda de 543 nm para AO y 488 nm para EtBr. Los portaobjetos se analizaron con un aumento de 40X y las imágenes digitales se guardaron como archivos TIFF no comprimidos y se exportaron al Programa Informático Photoshop CS (Adobe Systems) para el procesamiento de las imágenes y la presentación de copias impresas.

[0391] **Análisis estadístico:** Las diferencias estadísticas se evaluaron usando el ensayo de la t de Student para muestras no relacionadas. Los valores P se determinaron mediante un cálculo de dos colas, y un valor de P menor de 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

[0392] **Ánalisis de la expresión de la proteína PAX2 en células de próstata:** La expresión de la proteína PAX2 se examinó mediante análisis de Western en cultivo primario de próstata HPrEC y en líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP, DU145 y PC3. En este caso, se detectó proteína PAX2 en todas las líneas celulares de cáncer de próstata (Fig. 36A). Sin embargo, no pudo detectarse proteína PAX2 en HPrEC. Se separaron transferencias y se volvieron a sondar mediante β-actina como control interno para garantizar una carga igual. La expresión de la proteína PAX2 también se controló después de dirección selectiva e inhibición mediante ARNip específico de PAX2 en las líneas celulares de cáncer de próstata DU145, PC3 y LNCaP. Se proporcionó a las células una sola ronda de transfección con el conjunto de ARNip de PAX2 durante un periodo de tratamiento de 6 días. La proteína PAX2 se expresó en células de control tratadas solo con medio. La dirección específica del ARNm de PAX2 se confirmó observando la disminución de la expresión de la proteína PAX2 en las tres líneas celulares (Fig. 36B).

[0393] **Efecto de la disminución de la expresión de PAX2 en el crecimiento de células de cáncer de próstata:** El efecto de ARNip de PAX2 sobre el número de células y viabilidad celular se analizó usando microscopía óptica y análisis MTT. Para examinar el efecto del ARNip de PAX2 sobre el número de células, líneas celulares PC3, DU145 y LNCaP se transfecaron solo con medio, ARNip no específico o ARNip de PAX2 durante un periodo de 6 días. Cada una de las líneas celulares alcanzó una confluencia de 80-90% en discos de cultivo de 60 mm que solo contenían medio. El tratamiento de las líneas HPrEC, DU145, PC3 y LNCaP con ARNip no específico parecía tener poco o ningún efecto sobre el crecimiento celular en comparación con células tratadas solo con medio (Figs. 38A, 38C y 38E, respectivamente). El tratamiento de la línea celular nula para PAX2 HPrEC con ARNip de PAX2 pareció no tener efecto significativo sobre el crecimiento celular (Fig. 37B). Sin embargo, el tratamiento de las líneas

celulares de cáncer de próstata DU145, PC3 y LNCaP con ARNip de PAX2 dio como resultado una disminución significativa en el número de células (Figs. 38D, 38F y 38H, respectivamente).

[0394] Efecto de disminución de la expresión de PAX2 sobre la viabilidad de células de cáncer de próstata: La viabilidad celular se midió después de 2-, 4- y 6-días de exposición. La viabilidad en porcentaje se calculó como la proporción de la absorbancia a 570-630 nm de células tratadas con ARNip de PAX2 dividida entre células de control no tratadas. Como controles negativos, se midió la viabilidad celular después de cada periodo de tratamiento con ARNip no específico, de control negativo o solo con reactivo de transfección. La viabilidad celular relativa se calculó dividiendo el porcentaje de viabilidad después de tratamiento con ARNip de PAX2 entre el porcentaje de viabilidad después del tratamiento con ARNip no específico (Fig. 38). Después de 2 días de tratamiento, la viabilidad relativa fue de 116% en DU145, de 81% en PC3 y de 98% en LNCaP. Después de 4 días de tratamiento, la viabilidad celular relativa disminuyó a 69% en DU145, 79% en PC3 y 80% en LNCaP. Finalmente, a los 6 días la viabilidad relativa fue de 63% en DU145, 43% en PC3 y 44% en LNCaP. Además, la viabilidad celular también se midió después de tratamiento solo con reactivo de transfección. En este caso cada línea celular no mostró disminución significativa en cuanto a la viabilidad celular.

[0395] Detección de la actividad pan-caspasa. La actividad caspasa se detectó mediante análisis microscópico láser confocal. Se trataron células LNCaP, DU145 y PC3 con ARNip de PAX2 y la actividad se controló basándose en la unión de péptido marcado con FAM a caspasas en células sometidas activamente a apoptosis que emitieron fluorescencia verde. El análisis de células solo con medio muestra la presencia de células LNCaP, DU145 y PC3 viables, respectivamente. La excitación por láser confocal a 488 nm no produjo tinción verde detectable lo que indica que no hay actividad caspasa en las células no tratadas (Figs. 39A, 39C y 39E, respectivamente). Después de 4 días de tratamiento con ARNip de PAX2, las células LNCaP, DU145 y PC3 con fluorescencia presentaron tinción verde lo que indicaba actividad caspasa (Figs. 39B, 39D y 39F, respectivamente).

[0396] Efecto de la inhibición de PAX2 sobre factores apoptóticos: Se trataron células LNCaP, DU145 y PC3 con ARNip contra PAX2 durante 4 días y la expresión de factores pro y antiapoptóticos se midió mediante QRTPCR. Después de la disminución de la expresión de PAX2, análisis de BAD reveló un 2 veces en LNCaP, 1,58 veces en DU145 y 1,375 en PC3 (Fig. 40A). Los niveles de expresión de BID aumentaron 1,38 veces en LNCaP y 1,78 veces en DU145, mientras que no hubo diferencias significativas en BID observado en PC3 después de suprimir la expresión de PAX2 (Fig. 40B). El análisis del factor antiapoptótico AKT reveló una disminución de 1,25 veces en la expresión en LNCaP y disminución de 1,28 veces en DU145 después del tratamiento, pero no se observaron cambios en PC3. (Fig. 40C).

[0397] Análisis de integridad de membrana y necrosis: La integridad de membrana se controló mediante análisis confocal en células LNCaP, DU145 y PC3. En este caso, células intactas se tiñeron de verde debido a AO que es permeable a membrana, mientras que las células con membranas plasmáticas comprometidas se teñían de rojo debido a la incorporación de EtBr impermeable a membrana en el citoplasma y de amarillo debido a la colocalización de AO y EtBr en el núcleo. Las células LNCaP, DU145 y PC3 no tratadas se tiñeron positivamente con AO y emitieron color verde pero no se tiñeron con EtBr. Después de la disminución de la expresión de PAX2 no hubo modificaciones observables con respecto a la integridad de membranas en células LNCaP como indica la fluorescencia verde positiva con AO y ausencia de fluorescencia con EtBr roja. Este hallazgo indica adicionalmente que las células LNCaP pueden experimentar apoptosis pero no muerte celular necrótica después de disminución de la expresión de PAX2. De manera inversa, la disminución de la expresión de PAX2 en DU145 y PC3 dio como resultado la acumulación de EtBr en el citoplasma como se indica mediante la tinción roja. Además, tanto DU145 como PC3 poseían núcleos condensados que aparecían amarillos debido a la colocalización de tinción verde y roja de AO y EtBr, respectivamente. Estos resultados indican que DU145 y PC3 se someten a una ruta de muerte celular alternativa que implica muerte celular necrótica comparada con LNCaP.

50 F. Referencias

- Ady N, Morat L, Fizazi K, Soria JC, Mathieu MC, Prapotnick D, Sabatier L, Chauveinc L: Detection of HER-2/neu-positive circulating epithelial cells in prostate cancer patients. Br J Cancer 2004, 90:443-448.
- Bals R, Goldman MJ, Wilson JM. Mouse beta-defensin 1 is a salt-sensitive antimicrobial peptide present in epithelia of the lung and urogenital tract. Infect Immun. Mar 1998; 66(3):1225-32.
- Banchereau, J.; Palucka, A. K.; Dhodapkar, M.; Burkholder, S.; Taquet, N.; Rolland, A.; Taquet, S.; Coquery, S.; Wittkowski, K. M.; Bhardwaj, N.; Pineiro, L.; Steinman, R.; Fay, J., Immune and Clinical Responses in Patients with Metastatic Melanoma to CD34+ Progenitor-derived Dendritic Cell Vaccine. Cancer Res 2001, 61, (17), 6451-6458.
- Bensch KW, Raida M, Magert HJ, Schulz-Knappe P, Forssmann WG. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. FEBS Lett. 17 Jul 1995; 368(2):331-5.
- Benson & Olsson (1989) "The staging and grading of prostatic cancer" in The Prostate, ed Fitzpatrick, J. M. y Krane R. J. pp 261-272, Edimburgo, Churchill Livingstone.
- Bockmuhl, U.; Ishwad, C. S.; Ferrell, R. E.; Gollin, S. M., Association of 8p23 deletions with poor survival in head and neck cancer. Otolaryngol Head Neck Surg 2001, 124, (4), 451-5.

- Bodhoven, A.V. et al. Molecular characterization of Human Prostate Carcinoma Cell Lines, *Prostate* 57 (2003) 205-225.
- Boyd, K. E. y Farnham, P. J. Coexamination of site-specific transcription factor binding and promoter activity in living cells. *Mol Cell Biol*, 19: 8393-8399., 1999.
- 5 Braida, L., Boniotto, M., Pontillo, A., Tovo, P.A., Amoroso, A., Crovella, S., 2004. A singlenucleotide polymorphism in the human beta-defensin 1 gene is associated with HIV-1 infection in Italian children. *Aids* 18, 1598-1600. Discenzo, M.T., He, S., Lee, T.H., Chu, L.L., Bolon, B., Goodyer, P., Eccles, Buttiglieri, S.; Deregibus, M. C.; Bravo, S.; Cassoni, P.; Chiarle, R.; Bussolati, B.; Camussi, G., Role of PAX2 in apoptosis resistance and proinvasive phenotype of Kaposi's sarcoma cells. *J Biol Chem* 2004, 279, (6), 4136-43.
- 10 Carroll, A.G. et al. p53 oncogene mutations in three human prostate cancer cell lines, *Prostate* 23 (2) (1993) 123-134.
- Catalano, M. G.; Pfeffer, U.; Raineri, M.; Ferro, P.; Curto, A.; Capuzzi, P.; Corno, F.; Berta, L.; Fortunati, N., Altered expression of androgen-receptor isoforms in human colon-cancer tissues. *Int J Cancer* 2000, 86, (3), 325-30.
- Chaib, H.; MacDonald, J. W.; Vessella, R. L.; Washburn, J. G.; Quinn, J. E.; Odman, A.; Rubin, M. A.; Macoska, J. A., 15 Haploinsufficiency and reduced expression of genes localized to the 8p chromosomal region in human prostate tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2003, 37, (3), 306-13.
- Coultras, L.; Strasser, A., The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin Cancer Biol* 2003, 13, (2), 115-23.
- Davies et al., *Hum. Mol. Gen* Jan. 15, 13 (2); 235.
- Dearnaley DP, Sloane JP, Ormerod MG, Steele K, Coombes RC, Clink HM, Powles TJ, Ford HT, Gazet JC, Neville 20 AM: Increased detection of mammary carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen. *Br J Cancer* 1981, 44:85-90.
- Dhebi, M. et al. The paired-box transcription factor, PAX2, positively modulates expression of the Wilms' tumor suppressor gene (WT1), *Oncogene* 13 (1996) 447-453.
- Discenzo, M. T.; He, S.; Lee, T. H.; Chu, L. L.; Bolon, B.; Goodyer, P.; Eccles, M.; Pelletier, J., WT1 is a modifier of 25 the PAX2 mutant phenotype: cooperation and interaction between WT1 and PAX2. *Oncogene* 2003, 22, (50), 8145-55.
- Donald, C. D.; Sun, C. Q.; Lim, S. D.; Macoska, J.; Cohen, C.; Amin, M. B.; Young, A. N.; Ganz, T. A.; Marshall, F. F.; Petros, J. A., Cancer-specific loss of beta-defensin 1 in renal and prostatic carcinomas. *Lab Invest* 2003, 83, (4), 501-5.
- 30 Dorfler, P. et al. C-terminal activating and inhibitory domains determine the transactivation potential of BSAP (PAX-5), PAX-2 and PAX-8, *EMBO J*. 15 (8) (1996) 1971-1982.
- Dressler et al (1990) *Development* 109, 787-795
- Dressler GR, Douglass EC. Pax-2 is a DNA-binding protein expressed in embryonic kidney and Wilms tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(4):1179-1183.
- 35 Dressler GR, Woolf AS. PAX2 in development and renal disease. *Int J Dev Biol* 1999; 43(5):463-468.
- Dressler GR. Pax-2, kidney development, and oncogenesis. *Med Pediatr Oncol* 1996; 27(5):440-444.
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD: Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002, 3:991-998.
- Eccles MR, He S, Legge M, Kumar R, Fox J, Zhou C, French M, Tsai RW. PAX genes in development and disease: 40 the role of PAX2 in urogenital tract development. *Int J Dev Biol* 2002; 46(4):535-544.
- Eccles MR, Wallis LJ, Fidler AE, Spurr NK, Goodfellow PJ, Reeve AE. Expression of the PAX2 gene in human fetal kidney and Wilms' tumor. *Cell Growth Differ* 1992; 3(5):279-289.
- Eccles, M.R., HE, S., Legge, M., Kumar, R., Fox, J., Zhou, C., French, M., Tsai, R.W., 2002. PAX genes in development and disease: the role of PAX2 in urogenital tract development. *Int. J. Dev. Biol.* 46 (4), 535-544. Ganz, 45 T., 1999. Defensins and host defense. *Science* 286,420-421. Ganz, T., 2002. Immunology. Versatile defensins. *Science* 298, 977-979. Ganz, T., 2004. Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *CR Biol.* 327, 539-549.
- Eccleset M.R. et al. PAX genes in development and disease: the role of PAX2 in urogenital tract development, *Int. J. Dev. Biol.* 46 (4) (2002) 535-544.
- Fong, L.; Brockstedt, D.; Benike, C.; Breen, J. K.; Strang, G.; Ruegg, C. L.; Engleman, E. G., Dendritic Cell-Based 50 Xenoantigen Vaccination for Prostate Cancer Immunotherapy. *J Immunol* 2001, 167, (12), 7150-7156.
- Fonsato V. et al. Expression of Pax2 in human renal tumor-derived endothelial cells sustains apoptosis resistance and angiogenesis, *Am J Pathol*. Feb 2006; 168(2):706-1.
- Fromont, G.; Joulin, V.; Chantrel-Groussard, K.; Vallancien, G.; Guillonneau, B.; Validire, P.; Latil, A.; Cussenot, O., Allelic losses in localized prostate cancer: association with prognostic factors. *J Urol* 2003, 170, (4 Pt 1), 1394-7.
- 55 Fujii Y, Kageyama Y, Kawakami S, Kihara K, Oshima H: Detection of disseminated urothelial cancer cells in peripheral venous blood by a cytokeratin 20-specific nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Jpn J Cancer Res* 1999, 90:753-757.
- Gann et al (1995) *JAMA* 273, 289-294
- Ganz T, Weiss J. Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia. *Semin Hematol*. Oct 1997; 34(4):343-54
- 60 Ganz, T., Defensins and host defense. *Science* 1999, 286, (5439), 420-1.
- Ganz, T., Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *C R Biol* 2004, 327, (6), 539-49.
- Ganz, T., Immunology. Versatile defensins. *Science* 2002, 298, (5595), 977-9.
- Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H, Schreiber HW, Wagener C, Neumaier M: Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *J Clin Oncol* 1994, 12:725-65 729.

- Ghossein RA, Bhattacharya S, Rosai J: Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in solid tumors. *Clin Cancer Res* 1999, 5:1950-1960.
- Ghossein RA, Scher HI, Gerald WL, Kelly WK, Curley T, Amsterdam A, Zhang ZF, Rosai J: Detection of circulating tumor cells in patients with localized and metastatic prostatic carcinoma: clinical implications. *J Clin Oncol* 1995, 13:1195-1200.
- 5 Gibson, W., Green, A., Bullard, R.S., Eaddy, A.R., Donald, C.D., 2007. Inhibition of PAX2 expression results in alternate cell death pathways in prostate cancer cells differing in p53 status. *Cancer Lett.* 248 (2), 25 1-261.
- Gilbey AM, Burnett D, Coleman RE, Holen I: The detection of circulating breast cancer cells in blood. *J Clin Pathol* 2004, 57:903-911.
- 10 Gleason (1966) "Classification of prostatic carcinomas" *Cancer Chemother Rep* 50, 125-128
- Gnarra, J. R.; Dressler, G. R., Expression of Pax-2 in human renal cell carcinoma and growth inhibition by antisense oligonucleotides. *Cancer Res* 1995, 55, (18), 4092-8.
- Goldman MJ, Anderson GM, Stolzenberg ED, Kari UP, Zasloff M, Wilson JM. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell.* 21 Feb 1997; 88(4):553-60.
- 15 Gropp, R.; Frye, M.; Wagner, T. O.; Bargon, J., Epithelial defensins impair adenoviral infection: implication for adenovirus-mediated gene therapy. *Hum Gene Ther* 1999, 10, (6), 957-64.
- Gunther, M.; Wagner, E.; Ogris, M., Specific targets in tumor tissue for the delivery of therapeutic genes. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents* 2005, 5, (2), 157-71.
- Guseva, N.V. et al. Death receptor-induced cell death in prostate cancer, *J. Cell Biochem.* 91(2004) 70-99.
- 20 Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. A peptide antibiotic from human skin. *Nature.* 26 Jun 1997; 387(6636):861.
- Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *Biol Chem.* 23 Feb 2001; 276(8):5707-13.
- 25 Harder J, Siebert R, Zhang Y, Matthiesen P, Christophers E, Schlegelberger B, Schroder JM. Mapping of the gene encoding human beta-defensin-2 (DEFB2) to chromosome region 8p22-p23.1. *Genomics.* 15 Dic 1997; 46(3):472-5.
- Havik B, Ragnhildstveit E, Lorens JB, Saelemyr K, Fauske O, Knudsen LK, Fjose A. A novel paired domain DNA recognition motif can mediate PAX2 repression of gene transcription. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 266(2):532-541.
- 30 Hildebrandt M, Mapara MY, Korner IJ, Bargou RC, Moldenhauer G, Dorken B: Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)-controlled immunomagnetic purging of breast cancer cells using the magnetic cell separation (MACS) system: a sensitive method for monitoring purging efficiency. *Exp Hematol* 1997, 25:57-65.
- Hoon DS, Sarantou T, Doi F, Chi DD, Kuo C, Conrad AJ, Schmid P, Turner R, Giuliano A: Detection of metastatic breast cancer by b-hCG polymerase chain reaction. *Int J Cancer* 1996, 69:369-374.
- 35 Hueber et al. PAX2 inactivation enhances cisplatin-induced apoptosis in renal carcinoma cells, *Kidney Int.* Abr 2006; 69(7):1139-45.
- Hugel, A.; Wernert, N., Loss of heterozygosity (LOH), malignancy grade and clonality in microdissected prostate cancer. *Br J Cancer* 1999, 79, (3-4), 551-7.
- Ino K, Shibata K, Kajiyama H, Yamamoto E, Nagasaka T, Nawa A, Nomura S, Kikkawa F. Angiotensin II type 1 receptor expression in ovarian cancer and its correlation with tumor angiogenesis and patient survival. *Br J Cancer* 40 2006; 94(4):552-560.
- Isaacs, W.B. et al. Wild-type p53 suppresses growth of human prostate cancer cells containing mutant p53 alleles, *Cancer Res.* 51(1991) 4716-4720.
- Jackers, P., Szalai, G., y Watson, D. K. Ets-dependent regulation of target gene expression during megakaryopoiesis. En preparación, 2003.
- 45 Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Smigal, C., Thun, M.J., 2006. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J. Clin.* 56, 106-130.
- Jemal, A.; Tiwari, R. C.; Murray, T.; Ghafoor, A.; Samuels, A.; Ward, E.; Feuer, E. J.; Thun, M. J., Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 2004, 54, (1), 8-29.
- Jia HP, Schutte BC, Schudy A, Linzmeier R, Guthmiller JM, Johnson GK, Tack BF, Mitros JP, Rosenthal A, Ganz T, 50 McCray PB Jr. Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene.* 24 Ene 2001; 263(1-2):211-8.
- Jia HP, Wowk SA, Schutte BC, Lee SK, Vivado A, Tack BF, Bevins CL, McCray PB Jr. A novel murine beta -defensin expressed in tongue, esophagus, and trachea. *J Biol Chem.* 27 Oct 2000; 275(43):33314-20.
- Johnson PW, Burchill SA, Selby PJ: The molecular detection of circulating tumor cells. *Br J Cancer* 1995, 72:268-55 276.
- Jotsuka T, Okumura Y, Nakano S, Nitta H, Sato T, Miyachi M, Suzumura K, Yamashita J: Persistent evidence of circulating tumor cells detected by means of RT-PCR for CEA mRNA predicts early relapse: a prospective study in node-negative breast cancer. *Surgery* 2004, 135:419-426.
- Juin, P., Hunt, A., Littlewood, T., Griffiths, B., Brown-Swigart, L., Korsmeyer, S., Evan, G., 2002. c-Myc functionally 60 cooperates with Bax to induce apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 22, 6158-6169.
- Jung, J. E., Lee, J., Ha, J., Kim, S. S., Cho, Y. H., Baik, H. H., and Kang, I. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-ribonucleoside enhances oxidative stress-induced apoptosis through activation of nuclear factor- κ B in mouse Neuro 2a neuroblastoma cells. (2004) *Neurosci. Lett.* 354, 197-200
- Jurevic, R.J., Chrisman, P., Mancl, L., Livingston, R., Dale, B.A., 2002. Single-nucleotide polymorphisms and 65 haplotype analysis in beta-defensin genes in different ethnic populations. *Genet. Test* 6, 26 1-269.

- Kasahara, K. et al. Detection of genetic alterations in advanced prostate cancer by comparative genomic hybridization, *Cancer Genet. Cytogenet.* 137 (1) (2002) 59-63.
- Kefas, B. A., Cai, Y., Ling, Z., Heimberg, H., Hue, L., Pipeleers, D., y Van de Casteele, M. AMP-activated protein kinase can induce apoptosis of insulin-producing MIN6 cells through stimulation of c-Jun-N-terminal kinase. (2003) *J. Mol. Endocrinol.* 30, 151-161
- Kelloff, G.J., Lippman, S.M., Dannenberg, A.J., et al. Progress in chemoprevention drug development: the promise of molecular biomarkers for prevention of intraepithelial neoplasia and cancer--a plan to move forward. *Clin Cancer Res.* 15 Jun 2006; 12(12):3661-97.
- Khoubahi B, Kessling AM, Adshead JM, Smith GL, Smith RD, Ogden CW. Expression of the developmental and oncogenic PAX2 gene in human prostate cancer. *J Urol* 2001; 165(6 Pt 1):2115-2120.
- Krisanaprakornkit S, Weinberg A, Perez CN, Dale BA. Expression of the peptide antibiotic human beta-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect Immun.* Sep 1998; 66(9):4222-8.
- Lang D, Powell SK, Plummer RS, Young KP, Ruggeri BA. PAX genes: Roles in development, pathophysiology, and cancer. *Biochem Pharmacol* 2006.
- Lehrer, R.I., Ganz, T., 1996. Endogenous vertebrate antibiotics. Defensins, protegrins, and other cysteine-rich antimicrobial peptides. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 797, 228-239.
- Li, J., Jiang, P., Robinson, M., Lawrence, T. S., and Sun, Y. (2003) AMPK- β 1 subunit is a p53-independent stress responsive protein that inhibits tumor cell growth upon forced expression *Carcinogenesis* 24, 827-834
- Lin, S.; Ying, S. Y., Differentially expressed genes in activin-induced apoptotic LNCaP cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999, 257, (1), 187-92.
- Linzmeier, R.; Ho, C. H.; Hoang, B. V.; Ganz, T., A 450-kb contig of defensin genes on human chromosome 8p23. *Gene* 1999, 233, (1-2), 205-11.
- Liu, J., Wilson, T. E., Milbrandt, J., and Johnsen, M. Identifying DNA-binding sites and analyzing DNA-binding domains using a yeast selection system. *METHODS: A companion to Methods in Enzymology*, 5: 125-137, 1993.
- Discenza MT, He S, Lee TH, Chu LL, Bolon B, Goodyer P, Eccles M, Pelletier J., 2003. WT1 is a modifier of the Pax2 mutant phenotype: cooperation and interaction between WT1 and Pax2. *Oncogene* 22 (50), 8145-8155.
- Macoska, J. A.; Paris, P.; Collins, C.; Andaya, A.; Beheshti, B.; Chaib, H.; Kant, R.; Begley, L.; MacDonald, J. W.; Squire, J. A., Evolution of 8p loss in transformed human prostate epithelial cells. *Cancer Genet Cytogenet* 2004, 154, (1), 36-43.
- Mansouri, A. et al. Pax genes and their roles in cell differentiation and development, *Cur. Opin. Cell Biol.* 8 (1996) 851-857.
- Margue, C. M.; Bernasconi, M.; Barr, F. G.; Schafer, B. W., Transcriptional modulation of the anti-apoptotic protein BCL-XL by the paired box transcription factors PAX3 and PAX3/FKHR. *Oncogene* 2000, 19, (25), 2921-9.
- Margue, C.M. et al. Transcriptional modulation of the anti-apoptotic protein BCL-XL by the paired box transcription factors PAX3 and PAX3/FKHR, *Oncogene* 19 (25) (2003) 2921-2929.
- Margure, C.M. et al. Transcriptional modulation of the anti-apoptotic protein BCL-XL by the paired box transcription factors PAX3 and PAX3/FKHR, *Oncogene* 19 (2000) 2921-2929.
- Mathews M, Jia HP, Guthmiller JM, Losh G, Graham S, Johnson GK, Tack BF, McCray PB Jr. Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. *Infect Immun.* Jun 1999; 67(6):2740-5.
- Matsumura M, Niwa Y, Kato N, Komatsu Y, Shiina S, Kawabe T, Kawase T, Toyoshima H, Ihori M, Shiratori Y: Detection of a-fetoprotein mRNA, an indicator of hematogenous spreading hepatocellular carcinoma, in the circulation: a possible predictor of metastatic hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1994, 20:1418-1425.
- Maulbecker C C, Gruss P. The oncogenetic potential of Pax genes. *Embo J* 1993; 12(6):2361-7
- Mazal, P. R.; Stichenwirth, M.; Koller, A.; Blach, S.; Haitel, A.; Susani, M., Expression of aquaporins and PAX-2 compared to CD10 and cytokeratin 7 in renal neoplasms: a tissue microarray study. *Mod Pathol* 2005, 18, (4), 535-40.
- Mazzucchelli, R.; Barbisan, F.; Tarquini, L. M.; Galosi, A. B.; Stramazzotti, D., Molecular mechanisms in prostate cancer. A review. *Anal Quant Cytol Histol* 2004, 26, (3), 127-33.
- McConnell, M. J.; Cunliffe, H. E.; Chua, L. J.; Ward, T. A.; Eccles, M. R., Differential regulation of the human Wilms tumor suppressor gene (WT1) promoter by two isoforms of PAX2. *Oncogene* 1997, 14, (22), 2689-700.
- McCray PB Jr, Bentley L. Human airway epithelia express a beta-defensin. *Am J Respir Cell Mol Biol.* Mar 1997; 16(3):343-9.
- McNamara NA, Van R, Tuchin OS, Fleiszig SM. Iar surface epithelia express mRNA for human beta defensin-2Exp Eye Res. Nov 1999; 69(5):483-90.
- McNeel, D.G., Malkovsky, M., 2005. Immune-based therapies for prostate cancer. *Immunol. Lett.* 96, 3-9.
- Meisse, D., Van de Casteele, M., Beauloye, C., Hainault, I., Kefas, B. A., Rider, M. H., Foufelle, F., and Hue, L. Sustained activation of AMP-activated protein kinase induces c-Jun N-terminal kinase activation and apoptosis in liver cells. (2002) *FEBS Lett.* 526, 38-42
- Michalak, E.; Villunger, A.; Erlacher, M.; Strasser, A., Death squads enlisted by the tumor suppressor p53. *Biochem Biophys Res Commun* 2005, 331, (3), 786-98.
- Muratovska A, Zhou C, He S, Goodyer P, Eccles MR. Paired-Box genes are frequently expressed in cancer and often required for cancer cell survival. *Oncogene* 2003; 22(39):7989-7997.
- Murer, L.; Caridi, G.; Della Vella, M.; Montini, G.; Carasi, C.; Ghiggeri, G.; Zacchello, G., Expression of nuclear transcription factor PAX2 in renal biopsies of juvenile nephronophthisis. *Nephron* 2002, 91, (4), 588-93.
- Nakamura, Y. Isolation of p53-target genes and their functional analysis, *Cancer Sci.* 95 (1) (2004) 7-11.

- Nelson, W.G., De Marzo, A.M., DeWeese, T.L., Isaacs, W.B., 2004. The role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer. *J. Urol.* 172, S6-S 11 (discussion S11-S12).
- Nigro, J. M., Sikorski, R., Reed, S. I., and Vogelstein, B. Human p53 and CDC2Hs genes combine to inhibit the proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 12: 1357-1365., 1992.
- 5 Nishimura, M.; Abiko, Y.; Kurashige, Y.; Takeshima, M.; Yamazaki, M.; Kusano, K.; Saitoh, M.; Nakashima, K.; Inoue, T.; Kaku, T., Effect of defensin peptides on eukaryotic cells: primary epithelial cells, fibroblasts and squamous cell carcinoma cell lines. *Journal of Dermatological Science* 2004, 36, (2), 87.
- Noguchi S, Aihara T, Motomura K, Inaji H, Imaoka S, Koyama H: Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Comparison between MUC1 mRNA and keratin 19 mRNA amplification. *Am J Pathol* 1996, 148:649-656.
- O'Hara SM, Moreno JG, Zweitzig DR, Gross S, Gomella LG, Terstappen LW: Multigene reverse transcription-PCR profiling of circulating tumor cells in hormone-refractory prostate cancer. *Clin Chem* 2004, 50:826-835.
- Ogata, T.; Muroya, K.; Sasagawa, I.; Kosho, T.; Wakui, K.; Sakazume, S.; Ito, K.; Matsuo, N.; Ohashi, H.; Nagai, T., Genetic evidence for a novel gene(s) involved in urogenital development on 10q26. *Kidney Int* 2000, 58, (6), 2281-90.
- 15 O'Neil DA, Porter EM, Elewaut D, Anderson GM, Eckmann L, Ganz T, Kagnoff MF. Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol*. 15 Dic 1999; 163(12):6718-24.
- Orlando, V. Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem Sci*, 25: 99-104., 2000.
- Ostrom, L.; Tang, M. J.; Gruss, P.; Dressler, G. R., Reduced PAX2 gene dosage increases apoptosis and slows the progression of renal cystic disease. *Dev Biol* 2000, 219, (2), 250-8.
- Palapattu, G.S., Sutcliffe, S., Bastian, P.J., Platz, E.A., De Marzo, A.M., Isaacs, W.B., Nelson, W.G., 2005. Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights. *Carcinogenesis* 26, 1170-1181.
- Pantel K, Riethmuller G: Micrometastasis detection and treatment with monoclonal antibodies. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996, 213:1-18.
- 20 Papo, N., Shai, Y., 2005. Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. *Cell Mol. Life Sci.* 62,784-790.
- Perfettini, J. L.; Kroemer, R. T.; Kroemer, G., Fatal liaisons of p53 with Bax and Bak. *Nat Cell Biol* 2004, 6, (5), 386-8.
- Perfettini, J. L.; Roumier, T.; Kroemer, G., Mitochondrial fusion and fission in the control of apoptosis. *Trends Cell Biol* 2005, 15, (4), 179-83.
- Perfettini, J.L. et al. Fatal liaisons of p53 with Bax and Bak, *Nat. Cell Biol.* 6 (5) (2004) 386-388.
- 25 Perfettini, J.L. et al. Mitochondrial fusion and fission in the control of apoptosis, *Trends Cell Biol.* 15 (4) (2005) 179-183.
- Prasad, M.A., Trybus, T.M., Wojno, K.J., Macoska, J.A., 1998. Homozygous and frequent deletion of proximal 8p sequences in human prostate cancers: identification of a potential tumor suppressor gene site. *Genes Chromosomes Cancer* 23, 255-262.
- Raj GV, Moreno JG, Gomella LG: Utilization of polymerase chain reaction technology in the detection of solid tumors. *Cancer* 1998, 82:1419-1442.
- Reiger, K.M. et al. Human bladder carcinoma lines as indicators of oncogenic change relevant to urothelial neoplastic progression, *Br. J. Cancer* 72 (3) (1995) 683-690.
- Robson, E.J. et al. PANorama of PAX genes in cancer and development, *Nat. Rev. Cancer* 6 (1) (2006) 52-62.
- 30 Saitoh, M., Nagai, K., Nakagawa, K., Yamamura, T., Yamamoto, S., y Nishizaki, T. Adenosine induces apoptosis in the human gastric cancer cells via an intrinsic pathway relevant to activation of AMP-activated protein kinase. (2004) *Biochem. Pharmacol.* 67, 2005-2411
- Sanyanusin P et al (1996) Genomic structure of the PAX2 gene *Genomics* 35(1), 258-261
- Schmidt B, Anastasiadis AG, Seifert HH, Franke KH, Oya M, Ackermann R: Detection of circulating prostate cells 45 during radical prostatectomy by standardized PSMA RT-PCR: association with positive lymph nodes and high malignant grade. *Anticancer Res* 2003, 23:3991-3999.
- Seiden MV, Kantoff PW, Krishnaswami K, Propert K, Bryant M, Haltom E, aynes L, Kaplan I, Bubley G, DeWolf W, Sklar J: Detection of circulating tumor cells in men with localized prostate cancer. *J Clin Oncol* 1994, 12:2634-2639.
- Shariat SF, Kattan MW, Song W, Bernard D, Gottenger E, Wheeler TM, Slawin KM: Early postoperative peripheral blood reverse transcription PCR assay for prostate-specific antigen is associated with prostate cancer progression in patients undergoing radical prostatectomy. *Cancer Res* 2003, 63:5874-5878.
- 50 Sherman, H., Chapnik, N., Froy, O., 2006. Albumin and amino acids upregulate the expression of human beta-defensin 1. *Mol. Immunol.* 43, 1617-1623.
- Sikorski, R. S. y Hieter, P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of 55 DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 122: 19-27., 1989.
- Soeth E, Vogel I, Roder C, Juhl H, Marxsen J, Kruger U, Henne-Bruns D, Kremer B, Kalthoff H: Comparative analysis of bone marrow and venous blood isolates from gastrointestinal cancer patients for the detection of disseminated tumor cells using reverse transcription PCR. *Cancer Res* 1997, 57:3106-3110.
- Stambolic, V. et al. Negative regulation of PKB/Akt dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN, *Cell* Oct 2 60 95 (1) (1998) 29-39.
- Strasser, A. The role of BH3-only proteins in the immune system, *Nat. Rev. Immunol.* 5 (3) (2005) 189-200.
- Stuart E T et al Mammalian Pax genes. *Annual Review of Genetics* 1994; 28(219):219-36
- Stuart E T et al. PAX and HOX in neoplasia. *Advances in Genetics* 1995; 33(255):255-74.
- Stuart ET, Haffner R, Oren M, Gruss P. Loss of p53 function through PAX-mediated transcriptional repression. *Embo J* 1995; 14(22):5638-5645.

- Tagge, E. P.; Hanson, P.; Re, G. G.; Othersen, H. B., Jr.; Smith, C. D.; Garvin, A. J., Paired box gene expression in Wilms' tumor. *J Pediatr Surg* 1994; 29, (2), 134-41.
- Takeuchi, S.; Iida, M.; Kobayashi, S.; Jin, K.; Matsuda, T.; Kojima, H., Differential effects of phthalate esters on transcriptional activities via human estrogen receptors alpha and beta, and androgen receptor. *Toxicology* 2005; 210, 5 (2-3), 223-33.
- Teixeira, M. R.; Ribeiro, F. R.; Eknaes, M.; Waehre, H.; Stenwig, A. E.; Giercksky, K. E.; Heim, S.; Lothe, R. A., Genomic analysis of prostate carcinoma specimens obtained via ultrasound-guided needle biopsy may be of use in preoperative decision-making. *Cancer* 2004; 101, (8), 1786-93.
- Tepper, C.G. et al. Profiling of gene expression changes caused by p53 gain-of function mutant alleles in prostate 10 cancer cells, *Prostate* 65 (4) (2005) 375-389.
- Tien, A.H., Xu, L., Helgason, C.D., 2005. Altered immunity accompanies disease progression in a mouse model of prostate dysplasia. *Cancer Res.* 65, 2947-2955.
- Tokino, T.; Nakamura, Y., The role of p53-target genes in human cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2000; 33, (1), 1-6.
- Torres, M. et al. PAX-2 controls multiple steps of urogenital development, *Development* 121 (1995) 4057-4065.
- 15 Uemura H, Hasumi H, Ishiguro H, Teranishi J, Miyoshi Y, Kubota Y. Renin-angiotensin system is an important factor in hormone refractory prostate cancer. *Prostate* 2006; 66(8):822-830.
- Uemura H, Ishiguro H, Kubota Y. Angiotensin II receptor blocker: possibility of antitumor agent for prostate cancer. *Mini Rev Med Chem* 2006; 6(7):835-844.
- Valore EV, Park CH, Quayle AJ, Wiles KR, McCray PB Jr, Ganz T. Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide 20 of urogenital tissues. *J Clin Invest.* 15 Abr 1998; 101 (8):1633-42.
- Vecchione, A.; Ishii, H.; Baldassarre, G.; Bassi, P.; Trapasso, F.; Alder, H.; Pagano, F.; Gomella, L. G.; Croce, C. M.; Baffa, R., FEZ1/LZTS1 is down-regulated in high-grade bladder cancer, and its restoration suppresses tumorigenicity in transitional cell carcinoma cells. *Am J Pathol* 2002, 160, (4), 1345-52.
- Vogelstein, B. et al. The multi-step nature of cancer, *Trends Genet.* 9 (4) (1993) 138-141.
- 25 Wallin, J.J. et al. Dependence of BSAP repressor and activator functions on BSAP concentration, *Science* 279 (1998) 1961-1964.
- Wang ZP, Eisenberger MA, Carducci MA, Partin AW, Scher HI, Ts'o PO: Identification and characterization of circulating prostate carcinoma cells. *Cancer* 2000, 88:2787-2795.
- Wang, Z.; Lai, F. M., [Analysis of loss of heterozygosity on chromosome 8 in human prostate carcinoma and high 30 grade prostatic intraepithelial neoplasia]. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2004, 10, (1), 26-8, 31.
- Wells, J. and Farnham, P. J. Characterizing transcription factor binding sites using formaldehyde crosslinking and immunoprecipitation. *Methods*, 26: 48-56., 2002.
- Wilson, T. E., Fahrner, T. J., Johnston, M., y Milbrandt, J. Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science*, 252: 1296-1300., 1991.
- 35 Xiang, X., Saha, A. K., Wen, R., Ruderman, N. B., y Luo, Z. AMP-activated protein kinase activators can inhibit the growth of prostate cancer cells by multiple mechanisms. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321, 161-167
- Xu, Rould, Jun, Desplan and Pabo (1995) *Cell* 80, 639-650.
- Yang, D.; Biragyn, A.; Hoover, D. M.; Lubkowski, J.; Oppenheim, J. J., Multiple Roles of Antimicrobial Defensins, Cathelicidins, and Eosinophil-Derived Neurotoxin in Host Defense. *Annual Review of Immunology* 2004, 22, (1), 181-40 215.
- Ylikoski A, Pettersson K, Nurmi J, Irlala K, Karp M, Lilja H, Lovgren T, Nurmi M: Simultaneous quantification of prostate-specific antigen and human glandular kallikrein 2 mRNA in blood samples from patients with prostate cancer and benign disease. *Clin Chem* 2002, 48:1265-1271.
- Yuan SS, Yeh YT, Lee EY. Pax-2 interacts with RB and reverses its repression on the promoter of Rig-1, a Robo 45 member. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296(4):1019-1025.
- Zucht HD, Grabowsky J, Schrader M, Liepke C, Jurgens M, Schulz-Knappe P, Forssmann WG. Human beta-defensin-1: A urinary peptide present in variant molecular forms and its putative functional implication. *Eur J Med Res.* 20 Jul 1998; 3(7):315-23.

50 G. Secuencias

[0399]

- 1. SEC ID Nº: 1**
55 CCTTG
- 2. SEC ID Nº: 2**
AUAGACUCGACUUGACUUUU
- 3. SEC ID Nº: 3**
GAGGAAACGUGAUGAAGAUUU
- 60 **4. SEC ID Nº: 4**
AUCWCAUCACGUUUCUCUU
- 5. SEC ID Nº: 5**
GGACAAGAWGCUGAAUACUU
- 6. SEC ID Nº: 6**
65 GUAUUCAGCAAUCUUGUCCUU

7. SEC ID Nº: 7
 CAUCAGAGCACAUCAAAUCUU
8. SEC ID Nº: 8
 GAUUUGAUGUGCUCUGAUGUU
 5 **9. SEC ID Nº: 9**
 CTCCCTTCAGTCCGTCGAC
10. SEC ID Nº: 10
 CTCCCTTCACCTTG GTCG AC
11. SEC ID Nº: 11
 10 **12. SEC ID Nº: 12**
 CTCCCTTCACTCTG GTCGAC
13. SEC ID Nº: 13
 ACTGTGGCACCTCCCTCAGTCCGTCGACGAGGTTGTGC
14. SEC ID Nº: 14
 15 ACTGTGGCACCTCCCTCAGTCCGTCGACGAGGTTGTGC
15. SEC ID Nº: 15
 GAAGUCAAGUCGAGUCUAAU
16. SEC ID Nº: 16
 20 CCACCCATGGCAAATCCATGGCA
17. SEC ID Nº: 17
 CTCAGGCCTATGCAAAAAGAGGA
18. SEC ID Nº: 18
 AACCTACGCACCTACGTGAGGAG
 25 **19. SEC ID Nº: 19**
 GACACCTGAGCTGACCTTGG
20. SEC ID Nº: 20
 TCTAGACGGCAGGTCAAGGTCAACC
21. SEC ID Nº: 21
 30 GCCCTCCCTCCAAGGAGAC
22. SEC ID Nº: 22
 CGTTCAGTCCATCCCATTCTG
23. SEC ID Nº: 23
 GAGGAAGTCCAGTGTCCAGC
 35 **24. SEC ID Nº: 24**
 AGAAGTTCACCCCTGACTGT
25. SEC ID Nº: 25
 AGAAGTTCACGTTCCACTGT
26. SEC ID Nº: 26
 40 AGAAGTTCACGCTCTACTGT
27. SEC ID Nº: 27
 TTAGCGATTAGAAGTTCACCCCTGACTGTGGCACCTCCC
28. SEC ID Nº: 28
 GTTAGCGATTAGAAGTTCACGTTCCACTGTGGCACCTCCC
 45 **29. SEC ID Nº: 29**
 GTTAGCGATTAGAAGTTCACGCTCTACTGTGGCACCTCCC
30. SEC ID Nº: 30
 CCTGGCACCCAGCACAAT
31. SEC ID Nº: 31
 50 GTTGCCTGCCAGTCGCCATGAGAACTTCCTAC
32. SEC ID Nº: 32
 GCCGATCCACACGGAGTACT
33. SEC ID Nº: 33
 TGGCCTCCCTCTGTAACAGGTGCCTGAATT
 55 **34. SEC ID Nº: 34 (gen, promotor y exón 1 de proteína de caja emparejada (PAX2) de Homo sapiens; REFERENCIA L09748 AF433639)**

 MDMHCKADPFSAMHRHGVNQLGGVFVNGRPLPDVVRQRIVELAHQGVRPCDISRQLRVSHGCVSKILGRYY
 ETGSIKPGVIGGSKPKVATPKVVDKIAEYKRQNPTMFAWEIRDRLLAEGICDNDTVPSVSSIN

 60 **35. SEC ID Nº: 35 (gen, promotor y exón 1 de proteína de caja emparejada (PAX2) de Homo sapiens; REFERENCIA L09748 AF433639)**

1 ttcccccttt ccangagggc ctaatccgtt gcgcgcgcgc acgcggacac acacacacac
 61 acacacacac acacacacac acacacggcc cccatagcca ccgcaactct cagcagcagn
 121 ncctagctcc tctgaccggc ggecccaaga cggcgcccac aggaaccctt gggacgtct
 181 ggetccagge tggacgttagg cggagggtggc aggagtggac aaacccagge gggtecccaeg
 241 acgccccctt cctcggtct ctccctgttt cagccagccg ctctcgeccc tggtccccctc
 301 ttccctgcgt tagggtcctt tgtctccagc cacctcgcag cctgtcccg cctcgccg
 361 cctgccccctt gggcctccca gatctctctg gcgggtcccc ctgccttacc agctcccg
 421 tgtggcgcgc tcttcgcctg ctccctcacat ncacacagct gctggagag gagaaaggaa
 481 aggccgnccgc gcccggatg gatccgagac ggttagattt gtgcgggctc gcaaactctg
 541 ggaaacttaa ngcccggtct tccgcctc tncaactatg nccagcgcgg cccggtcgc
 601 cgcgcctacc cccggggggac ccttccctt tccctgtatcc cggcgcgc tgttcgctt
 661 cctctggctc cccagccctt ggagtggctt ccctggccct gcactccgtt cccttcggc
 721 cgccccccgc tgtegcctgc ccccaacctc cgcagggtccc acggtcgcgg cggcgtatgc
 781 tgtggaggta acgccccggga cgtctgggt cagccctgcac cgttcctc gaccacagcc
 841 cgatgaggcc gccccgtccg ggcccgctgc taagagagtt aatcattact tcgcacgc
 901 caactcgcct ccccttcgca ctctctcgcc cgccttaggg gaggaggaa ggggacagct
 961 ggcagggtgg ggacttcgc ttcgcacaaa ccagecttcc caggccctccc agagacaggt
 1021 ggtggcttct cagttccctc ggcaactctc taaggctctc tttcttcctt ccctgtctct
 1081 ccctccctcg agccctccctc cagccaggcc tctccccacc gtctccctgc cgcctctggct
 1141 ttgactgatt aactgcaggc cctggggagaa ccaactttct ttgtttggaa ccggacccg
 1201 cgggatttcc ttcccttagt ctccgcctat gggccagctc ctcccgacgg ttttggccg
 1261 ctggctgaag aggaccgcgc ctgaggccac aattaaccgg gctgttggtg gtgggtgggt
 1321 ggggggtgggc agtgaggaaat ttaaccgcata ctctagcagc tgccgtgggtg cagttgggag

5401 agacaaaaggg cttctttctg cctgggtcgaa tgccagcggaa cccccagcggag caagggagct
 5461 agtgccaaag agaactcgaa aggctccggc aggagatgggg aogtccccgt ggttgcgcct
 5521 cctgcgttcg ccccgatcc accgagctag cagcgggcgg egctcagccg cgtccgcgc
 5581 ctccttcttccc ccccaagccgg ggagagccag cctcgatcc cacatccctc gecgcgcagcg
 5641 acctgcagct cccgactgtt tccctccctt gtaaaaaattt cccagtccacc cgagggttca
 5701 gaaaccaagt ccccccggatcc tcccgccatc cgctgggtcc caccggggca ggtgggtact
 5761 cgccggaggt ttccagctcc attctgaacc aagcggttcg gactgcccgg acccggtggg
 5821 caaggggact ggggaggccc tgccacagt cgccgtggaa gggagggggac aagacaaact
 5881 gctggacact ttccctgtggaa atgagaatgt ggggggtcgct ggggtggaaag gtaccccg
 5941 agggaaaaggc caaagggaaag gaccagaaaag agagggaaagga agagccggaa aggaacggaa
 6001 gggaaactcgagcccgagggtt ggtgggggtt gggcttagggaa tgccactgg gccccggggcc
 6061 gcccggccca ggcggggact ggcctggaa tggcggggctt gggcgagttt gaactgagag
 6121 cccggcttca cagcgcagcg cgctccggagg ccctctgtcg ttacctgaat attcattaga
 6181 ctgacccgttca ttatcccttataaegttt atcttatacg cgagtttgtt ttctcgtgt
 6241 agtttaatcccggttccccc attcccccttcccgatcccgatcccgatcccgatcccgatcc
 6301 ttccggcgctt gtcctccccc tccctccccc ccatttcgttccctccctccctccctccctcc
 6361 cggcaceggaa gtgacaggctt cggggccctt ctcggccggaa gtcggccggcc cagcgctgg
 6421 gaatcacaga gtgggtggaaat ctattgcctt tgcgtgcataa gtcatccatc tccggcgcgc
 6481 gggggggggaa ggagggtctgg agggggctttt gcaatgtttt gagagacaca caccggggac
 6541 cgaggcttca gtcctccggc gagtttcttca gcaatggccaa cccacccggggcc cccacccgg
 6601 agctggccagc gcogetcggtt tccctccccc ctcggccggcc ctcggccggcc ggcggcgtgc
 6661 gcctgccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcc
 6721 cggacatccccccggattgttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcc
 6781 gggccggcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcc
 6841 gcctcttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcc
 6901 gcccggccgttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcc
 6961 gccccggggcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcc
 7021 actcggttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcc
 7081 ccccccggcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcc
 7141 ccctcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcc
 7201 cgcgcgttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcc
 7261 cggatgttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcc
 7321 ccctgtccatcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcc

36. SEC ID Nº: 36 (Gen de caja emparejada 2 (PAX2) de Homo sapiens; REFERENCIA NM_003987)

MDMHCKADPPFSAMHPGHHGVNQLGGVFVNGRPLPDVVRQRIVELAHQGVRPCDISRQLRVSHGCVKILGRY
 YETGSIKPGVIGSKPKVATPKVVDKIAEYKRQNPTMFAWEIRDRLAEGICDNDTVPSSINRIIRTKVQ
 QPFHPTPDGAGTGTAPGHTIPSTASPPVSSASNDPVGYSINGILGIPRSNGEKRKDEVEVYTDPAHIR
 GGGGLHLVWTLRDVSEGSVPNGDSQSGVDSLRLKHLRADTFQQQLEALDRVFERPSYPDVFPQASEHIKSEQG
 NEYSLPALTPGLDEVKSSLASTNPPELGSNVSGTQTYPVVTGRDMASTTLPGYPPHPPTGQGSYPTSTLAG
 MVPGSEFSGNPYSHPQYTAYNEAWRFSNPALLSPYYSAAPRSAPAAAAAYDRH

5

37. SEC ID Nº: 37 (Gen de caja emparejada 2 (PAX2) de Homo sapiens; REFERENCIA NM_003987)

1 aggtccagt ctccggccga gtcttctgc acccgcaacc caccctggggc cagcccgag
 61 ctggccagegc cgctcggttcc ctcctccccc tccctggccctt tggccgggg eggegtgcgc
 121 ctgccttttc cgggggggggg ggcctggccc gogegctccc ctcctccggc cgccacccctcg
 181 gacatccccggatccatgttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcc
 241 cccggctccc ctccggccgc ectctgaccg ccccccggggcc gcegcttcccttcccttcccttcc
 301 ctctcgatcc accaggttcc accggagctg agcgatgtcc ctcccccggcc cagttcagc
 361 cctggctgca gtcgcggccg gggccatggc ccccccggcc acccccggcc gcccacccgc
 421 cccggggccatccatgttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcc
 481 tgcagttgca agctccggcc accccggagg agcccccggcc gggagccggag ttttgcggcc
 541 cccggcccccggcc accggccgggg cgttcaactca tccctcccttcccttcccttcccttcccttcc
 601 ctcccttttc tccctcaatgttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcc
 661 cgctgcgttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcc
 721 ccatgcaccc accggccacgggg ggtgtgaacc agctcggggg ggtgtttgtt aacggccggcc
 781 ccctacccggatccatgttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcc
 841 gtgacatcttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcc
 901 actacgagac cggcagcatc accggccgggtt gatcggttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcc
 961 cggccaaaggatccatgttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcc
 1021 gggagatccatgttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcccttcc

1081 tctctttccat caacagaata atccggacca aagttcagca gcctttccac ccaacgcggg
1141 atggggctgg gacaggagt accggccccgt gcccacaccat tggtcccgac acggccctccc
1201 ctctgttcc cagcgcctcc aatgaccagg tgggatccct ctcacatcaat gggatcttgg
1261 ggatctctcg ctccaatgtt gagaagagga aacgtgtga agttgaggta taactgtatc
1321 ctgcccacat tagaggaggt ggaggttgc atctggctcg gactttaaaga gatgtgtctg
1381 agggtctcagt ccccaatgg aattcccaaga gtgggtgtgg aagtttgccg aagcaattgc
1441 gagctgacac ctteacccag cageagctgg aagetttgg a cgggtcttt gaggttcctt
1501 cctaccctga cgttccatc gcatcagagc acatcaaatac agaacagggg aacgagtaact
1561 ccctcccaagc cctgacccct gggcttgc aagtcaagtc gagtctatct gcatccacca
1621 acctgtacgt gggcageaaac gtgtcaggca cacagacata cccagttgtg actggctgtg
1681 acatggcgag caccactcg cctgttacc cccctcaat gccccccact ggcaggggaa
1741 getaccccac ctccacccctg gcaggaatgg tgccctgggg cgagtcttcc ggaacccctg
1801 acaggccacc ctagtacacg gcttacaaacg aggcttgggg attcagcaac cccgccttac
1861 taatgttcccc ttattattat agtgcgeeecccggc cccgttccgc cccgttccgc
1921 cctatgacccg ccaacttagtta cccggggggac catatcaacg ttcaaggccg cagttccgc
1981 ctccacatcg tccccgttgc accccacccc ggaggggggg aggaccggc cgaacggatg
2041 ccctccggcc accggcccaag ccttacccca tccccacggacc cccgcaccc ttacatcatc
2101 cccccctcgaa ggtoggacag gacgggttgg gccgtggcg ggaccctcag gcccggggcc
2161 gcccggggcc gccccctcg ccccccctcc cccgttccgc gactgcggc ggcgggttag
2221 ggggatctgg cccagtcgtt cccgttccgc accaagccag cccgaagcc cgcacggcc
2281 cctgcgggac togggctggc cctgttggcg cccgttccgc gtttctgtga cacacaatca
2341 gcgccggaccg cagcgcggcc cagccccggg caccggccctt ggacgcgtgg ggcggcaggag
2401 gtttgcgtgg aggggttggg ccaaggagat taagaagaaa acgactttctt gcaaggaggaa
2461 gageccgtt cccgttccctt gggaaaaattt ctttcccccc agtgcceagcc ggaetggcc
2521 cgccttcggg gtgtgttccgg tccccagaaga tggaatgggg gtgtgggggtt cccgttccgt
2581 gaacgggctt tggggggcgc aggttcttcc aaggttgggg cccaaaggatc gggggggcc
2641 gcagccccca cccatgttcc cccgttccgtt gtttcttccact gtttcttccgt geetgcctag
2701 tttttccctggg cccggccacctt cctgttccgtt gacccggccctt tcagooctgc ttggcccttca
2761 cctcagcgtc ttttccaccc ttttccgttccgtt cccgttccgtt ttttccgttccgt
2821 tcccttgacg cccgttccgtt ttttccgttccgtt cccgttccgtt cccgttccgtt
2881 ccggccggcc accgttccctt atagactgcg gactgggggtt ttttccgttccgtt agtacttgc
2941 tggcccttcc cccggacacag acttccatc tggccctgggtt aagaacccgtt ttttccgttccgt
3001 cgttgcgtt gtttccgttccgtt gggaaatgggg gtttccgttccgtt ttttccgttccgt
3061 ccageccctt cccggccggcc gaaactgaaca gaaaccacaaa aagtttccatc ttttccgttccgt
3121 tggatgttcc tggatgttcc aacaaaagg aacaaaacaa cccggccgtt cccggccgtt
3181 gaaagacgggt tggatgttcc tggatgttcc aacaaaagg aacaaaacaa cccggccgtt
3241 cccggccggcc cccggccgtt cccggccgtt cccggccgtt cccggccgtt
3301 ccgttgcgtt tggatgttcc tggatgttcc aacaaaagg aacaaaacaa cccggccgtt
3361 cggccattaa agcacagcac gtttccgttcc tggatgttcc aacaaaagg aacaaaacaa
3421 attacgaaag aaaagaaaatc ttttccgttcc tggatgttcc aacaaaagg aacaaaacaa
3481 gctgttttgc tggatgttcc tggatgttcc aacaaaagg aacaaaacaa cccggccgtt
3541 ctctccctt cccgttccgtt cccgttccgtt cccgttccgtt cccgttccgtt
3601 ttttccgttcc tggatgttcc tggatgttcc aacaaaagg aacaaaacaa cccggccgtt
3661 cccggccggcc tggatgttcc tggatgttcc aacaaaagg aacaaaacaa cccggccgtt
3721 cccgttccgtt cccgttccgtt cccgttccgtt cccgttccgtt
3781 cccgttccgtt cccgttccgtt cccgttccgtt cccgttccgtt
3841 tgacgactcg aaataacaga aacaaaagg aacaaaagg aacaaaacaa cccggccgtt
3901 caaatccgaa aaggcttgg aacaaaagg aacaaaagg aacaaaacaa cccggccgtt
3961 ttgagaaggg aaaaagaaaa aacaaaagg aacaaaagg aacaaaacaa cccggccgtt
4021 agtggcccgaa acggggccggc gggggccggc aacaaaagg aacaaaacaa cccggccgtt
4081 tggggggctg gggggccggc gggggccggc aacaaaagg aacaaaacaa cccggccgtt
4141 ccggacgggtt tggatgttcc tggatgttcc aacaaaagg aacaaaacaa cccggccgtt
4201 ttttccgttcc tggatgttcc tggatgttcc aacaaaagg aacaaaacaa cccggccgtt
4261 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

38. SEC ID Nº: 38 (Gen de caja emparejada 2 (PAX2) de Homo sapiens, variante de transcripto b; REFERENCIA NM_000278)

MDMHCKADPPSAMHPGHGGVNQLGGVFVNGRPLPDVVRQRIVELAHQGVRPCDISRQLRVSHGCVSKILGRY
YETGSIKPGVIGGSKPKVATPKVVDKIAEYKRQNPTMFAWEIRDRLLAEGICDNDTVPSSINRIIRTKVQ
QPFHPTPDGAGTGVTAPGHTIVPSTASPPVSSASNDPGSYSINGILGIIPRSNGEKRKRDEDVSEGSPNGD
SQSGVDSLRKHLRADTFTQQQLEALDRVFERPSYPDVFQASEHIKSEQGNEYSLPALTPGLDEVKSSLAST
NPELGSNVSGTQTYPVVTGRDMASTTLPGYPPHPPTGQGSYPTSTLAGMVPGSEFSGNPYSHPQYTAYNEA
WRFSNPALLSSPYYSAAPRSAAPAAAAAYDRH

39. SEC ID Nº: 39 (Gen de caja emparejada 2 (PAX2) de Homo sapiens, variante de transcripto b; REFERENCIA NM_000278)

1 aggttcggat cttccggcccg gtcttctege agccgcaccc caccctggggc cagccccagg
61 ctggcccgcc cgctcggtcc cctccctccc tcccgccct tcggccgccc cggcgctgcgc
121 ctgcctttc cggggggccgg ggccttggcc gcgegetccc ctcggcagg cgccacactcg
181 gacatccccg ggattgtcac ttctctgcca acttgcacca ctcggccagca cttggagagg
241 cccggctccc ctccggcgc cctctgaccg ccccccggcc ggcgcgtctc cgaccaccgc
301 ctctcgatg accaggtcc agggagatg aegagatgec ctcggccgccc cagttcagc
361 cctggctgca gctcagcgc gagccatgag ccccccagtgc acceccggccc ggccccacccg
421 cccggggccca ttctgtcac cgcccaagccc cgagccccga cagtggcaag ttgeggctac
481 tgcatgtca agtcccgcc aaccggagg agcccccagcg gggagcgcag tggcggcc
541 cccgcccccg cgccccccgc agcagccggg cgttcaactca tcctccctcc cccacccgtcc
601 ctccctttc tcctcaagtc ctgaagttga gtttgagagg cgacacggog goggccggccg
661 cgtgtctcc getccctgtc ctccccatgg atatgcactg caaagcagac cccttctccg
721 cgtgcaccc agggcaccgg ggtgtgaacc agctcggggg ggtgttgtg aacggcgggc
781 ccctaccgc cgtgggtgagg cagggcactcg tggagctggc ccaccagggt gtggggccct
841 gtgacatctc cggcagctg cgggtcagcc acggctgtg cagcaaaaatc ctggcaggt
901 actacgagac cggcagcata aacccgggtg tgcgttgtg ctccaaagcc aaatggcga
961 cggccaaagt ggtggacaag attgtcaat acaaaccgaca gaaccggact atgtcgcc
1021 gggagattcg agaccggcc tcggccgagg gcatctgtga caatgacaca gtggccagcg
1081 tctcttccat caacagaatc atccggacca aagttcagca gcctttccac ccaacccggg
1141 atggggctgg gacaggagtg accccccctg gccacacccat tggtccccgc acggccctcc
1201 ctctgttcc cagccctcc aatgaccctg tggatcccta ctccatcaat gggatctgg
1261 ggattccctcg ctccaaatgg gagaagagga aacgtatgt aagatgtgtt gaggggctcg
1321 tccccaaatgg agattcccg agtgggtgtgg acagtttgcg gaagcacttg cagactgaca
1381 cttcaccaca gcagcagctg gaagcttgg atcgggtct tgagcttccct tcctaccctg
1441 acgtcttcca ggcatacgag cacatcaa at cagaacaggg gaacgagttac tcctcccg
1501 cccgtacccc tgggcttgcgtaa gaagtcaagt cagatccatc tgcattccacc aaccctgagc
1561 tggcagccaa cgtgtcaggc acacagacat acccaggatg gactggctgt gacatggcga
1621 gcaccactct gcctgggtac ccccttcacg tgcoccccccac tggccaggga agtacccca
1681 ccccccaccc ggcaggatg gtgcctgggac gcgagttctc cggcaaccccg tacagccacc
1741 cccagttacac ggcctacaa gaggcttggg gattcagca ccccgcccta ctaagtcccc
1801 ctattattaa tagtgcggcc ccccggtcoo cccctggccgc tgctgcggct gcttatgacc
1861 gccacttagt acccgccggga ccacatcaag ttccaggccgc acagcttgcg cctccacatc
1921 gttccccgtct gaccccccaccc cggagggggg gaggaccgac ggcacgcat gcttccccgg
1981 caccggccca gcttcaccc atccacacgac ccccgcaacc ttccacatca ccccccctega
2041 agtccggaca ggacgggtgg ageccgtggc gggaccctca gggccggggcc cggccggcccc
2101 accccccctt gggccccctt cccgcttgcg tggactgcgc ggcggccgtga ggggatcteg
2161 gcccagctg tccggccctt cccaaagccca gccccggaaaccc cccggccggca cccctgggca
2221 ctccggccgc acctgttgcg ggcggccggaa ttttctgtg acacacata aegccgggacc
2281 gcagcgcggc ccagccccgg gcaccggcoo cggacgtcg ggcggccagg ggttctcg
2341 gaggggctgg gccaaggaga ttaagaagaa aacgactttc tgccaggagga agagccccgt
2401 gccgaatccc tggaaaaaat tcttttcccc cagtgcacgc cggactgcgg tcgccttcg
2461 ggtgtccct gtcccagaaat atggaaatggg ggtgtggggg tccggctcta ggaacgggct
2521 trggggcggt caggctttc caaggttggg acccaaggat cggggggggcc agcagccccg
2581 accgatcgag cccgactctc ggcttccac tgcttctctt ggcctgceta gttccccagg
2641 gcccggcacc tcctgtcg agacccggct ctcagccctg ctttgcctt acctcagegt
2701 ctcttccacc tgctggcctt ccagttttcc ctcttgcacag tccttgcctt gtccttgcac
2761 gcccgtccatc ctccctccctg actccggccccc ccacccggac ctcccccggg acccggccag
2821 gaccagtttc catagactgc ggactgggtt ctccctccag cagtacttg atgccccccctc
2881 ccccgacaca gactctcaat ctggccgggtt taagaacccg ttctgagctg ggttctgagc
2941 tgctcgccggg tggaaatgggg gggctgcacca ctccactctt ccacatccct cccageetee
3001 tccctccggca ggaactgaac agaaccacaa aaagtctaca ttatattaaat atgatgttct
3061 ttgcaaaaag gaacaaaaca acacaaaagec ccaccaggat gtcgtttgt gggaaagacgg
3121 tggatgttgcgt gtgaaggccgaa aaccgggtgt acataacccc tccccctccg cccggccccg
3181 cccggcccccg tagatctcc tgcggccccc ggccttgcet gtatagacgc cccgtgtct
3241 gtgtgttagat gtcggccctg cgttgggggg gaaaggggggg acacagatc acgccccatc
3301 aagcacacca cgttccggg gggggggcc tttttatgt tacaaaaaaaaa aattacgaaa
3361 gaaaagaaat ctctatgcaat aatgacgaac atggctctgt ggactctctt ggcctgttt
3421 gtggcttcc tctctgtat tccgtgtttt cgttcttcc tccctggccc tcttccctc
3481 tccctccctc tccctcccg tctcttccccc tctctgtctt gtcctctctt gtcctgtcg
3541 ctcttgcgtcg tctgtctcg ctcttccctc ggcctctctc cccagacccgt gccggccgc
3601 ctctgtctcg caggcttagat cggagggtggc agtccacgc cccgggtctg cccctccctc
3661 ggcgtggccc ggcggccccc ggcggccggaa ggcggggccg cccgggtcccg cccctctc
3721 qcttttccq tagtggccat ggccttgcac tgcgttccca cccqtqgatc gtcacgactc

3781 gaaataaacag aaacaaaagtca aataaaagtga aaataaaataa aaatccttga acaaatccga
3841 aaaggcttgg agtcctcgcc cagatctctc tcccctgcga gccctttta tttgagaagg
3901 aaaaagagaa aagagaatcg tttaaaggaa cccggcgccc agccaggctc cagtggcccg
3961 aacggggcggt cgaggcgccg gagggcgccg aggccggcc catcccagtc ctgtggggct
4021 ggccgggcag agaccccgga cccagggccca ggcttaacct gctaaatgtc cccggacggt
4081 tctggcttcc tcggccactt tcagtgegtc ggttctgttt gattttttt cttttgtca
4141 cataagaaaat aaataataat aataaataaaa gaataaaaatt ttgtatgtca aaaaaaaaaa
4201 aaaaaaaa

40. SEC ID Nº: 40 (Gen de caja emparejada 2 (PAX2) de Homo sapiens, variante de transcripto c; REFERENCIA NM_003988)

MDMHCKADPPSAMHPGHGGVNQLGGVFVNGRPLPDVVRQRIVELAHQGVRPCDISRQLRVSHGCVSKILGRY
YETGSIKPGVIGGSKPKVATPKVVDKIAEYKRQNPTMFAWEIRDRLAEGICDNDTVPSVSSINRIIRTKVQ
QPFPHTPDGAGTGVTA PGHTIVPSTASPPVSSASNDPVGSYSINGILGIPRSNGEKRKRDEDVSEGSVPNGD
SQSGVDSLRLKHLRADTFTQQQLEALDRVFERPSYPDVFQASEHIKSEQGNEYSLPALTPGLDEVKSSLAST
NPELGSNVSGTQTYPPVTGRDMASTTLPGYPPHPPTGQGSYPTSTLAGMVPEAVGPSSSLMSKPGRKLA
VPPCVQPTGASSPATRTATPSTRPTRLGDSATPPY

5

41. SEC ID Nº: 41 (Gen de caja emparejada 2 (PAX2) de Homo sapiens, variante de transcripto c; REFERENCIA NM_003988)

1 aggtttccat cttttttttt gttttttttt tttttttttt
61 ctggccatccgc cttttttttt tttttttttt tttttttttt
121 ctgttttttc cttttttttt tttttttttt tttttttttt
181 gacatcccccg ggattgtctac ttcttgcata atcttgcata
241 cccggctccc ctccccggcgc cttttttttt tttttttttt
301 ctctcgatg accagggttcc agggggatgtg aatggatgtc
361 cctggctgca gctgcagcgc gagccatgcg ccccccagtgc
421 cccggggcca ttctgtgtac cgcccaagccc cgagccccca
481 tgcatgttgc aatgggggggggggggggggggggggggggggg
541 ccggcccccccg cggcccccccg aatgggggggggggggggggg
601 ctccttttc tttttttttt tttttttttt tttttttttt
661 ctgtgtcccccc gttttttttt tttttttttt tttttttttt
721 ctatgttgcgggggggggggggggggggggggggggggggggg
781 ccctaccggaa cttttttttt tttttttttt tttttttttt
841 gtgacatctc cttttttttt tttttttttt tttttttttt
901 actacggacat cttttttttt tttttttttt tttttttttt
961 cggccaaatgtt gttttttttt tttttttttt tttttttttt
1021 gggagattcg agacccggctc tttttttttt tttttttttt
1081 tctttccat caacagaatc tttttttttt tttttttttt
1141 atggggctgg gacaggatgtt tttttttttt tttttttttt
1201 ctctgtttc cttttttttt tttttttttt tttttttttt
1261 ggattctcg gttttttttt tttttttttt tttttttttt
1321 tcccaatgg agattccatgtt tttttttttt tttttttttt
1381 cttcaaaaaa gttttttttt tttttttttt tttttttttt
1441 acgtttccca gggatcagag tttttttttt tttttttttt
1501 ccctgacccc tttttttttt tttttttttt tttttttttt
1561 tggcagcaa cttttttttt tttttttttt tttttttttt
1621 gcaccaactt cttttttttt tttttttttt tttttttttt
1681 cttccacccct gggcggaaatgtt tttttttttt tttttttttt
1741 gcaaggccggg ggggggggggggggggggggggggggggggg
1801 ctccggcaac cttttttttt tttttttttt tttttttttt
1861 caaccccccgc tttttttttt tttttttttt tttttttttt
1921 ctgtgtgtcc gttttttttt tttttttttt tttttttttt
1981 ccgacagttt gttttttttt tttttttttt tttttttttt
2041 gaegcgacgc gttttttttt tttttttttt tttttttttt
2101 acccttcaca tttttttttt tttttttttt tttttttttt
2161 tcaggccggg ggggggggggggggggggggggggggggggg
2221 cggggccggg tttttttttt tttttttttt tttttttttt
2281 agccggccag cttttttttt tttttttttt tttttttttt
2341 gtgacacaca tttttttttt tttttttttt tttttttttt
2401 tggggccca ggggggtttt tttttttttt tttttttttt
2461 ttctgtgttgc ggggggggggggggggggggggggggggg
2521 agccggactg cttttttttt tttttttttt tttttttttt

2581	gggtccgggt	cttaggaacgg	gttttggggg	cgtcagggtct	ttccaagggtt	gggacccaaag
2641	gategggggg	cccagcagcc	cgcacccatc	gagccggact	ctcggtctt	cactgtctt
2701	cctggactgc	ctagttcccc	agggccggc	acctctctgt	gctctcagcc	
2761	ctgecttgc	cctacccctag	egtccttcc	acctgtgtgc	ctcccaaggtt	ccccctctgc
2821	cagtccctcg	cctgtcccc	gacgcctgc	atccctctcc	ctgactcgca	gccccatcg
2881	acgctctccc	gggaccggcg	caggaccagt	ttccatagac	tgeggactgg	ggttttctc
2941	cagcagttac	ttgatgcccc	cctcccccac	acagactctc	aatctgcgg	tggtaagaac
3001	cggttctgag	ctggcgtctg	agctgtcg	gggtgaaagt	ggggggctgc	ccactccact
3061	cctcccatcc	cctcccaagec	tectctcccg	gcagggactg	aacagaacca	aaaaaagtct
3121	acattttttt	aatatgtatgg	ttttgc当地	aaggaacaaa	acaacacaaa	agccaccag
3181	gctgtgtott	tgtggaaaga	cggtgtgtgt	cgtgtgaagg	cgaaacccgg	tgtacataaac
3241	ccctccccct	cggccccggc	cggccggcc	cctgtagagtc	cctgtcgccc	gccggccctg
3301	cctgttagata	cggcccgctg	tctgtgtgt	gagagtcgccc	gtcgctggg	ggggaaagggg
3361	gggacacacgc	tacacgcocca	ttaaagcaca	gcacgtctg	ggggaggggg	gcatttttta
3421	tgttacaaaa	aaaattacg	aaagaaaaga	aatctctatg	caaaatgacg	aacatggtcc
3481	tgtggactcc	tctggcctgt	tttgttggct	ctttctctgt	attccctgt	tttcgtcttt
3541	tcctccctgc	cctctetetc	ctctggccct	ctctctctc	cgcttccttc	ccccctctgtc
3601	tctgtctctc	tcggctctcg	tcgtcttgc	ctgtctgtct	ctgtcttttc	ctcggtctct
3661	cctccccagac	ctggcccgcc	cggccctgtt	cggcaggctc	gatccgaggt	ggcagctcca
3721	gccccccggc	tcggccccc	gccccggctgc	cggccggcc	ccggccggcc	gaaggccggg
3781	ccgccccgtc	cggcccgta	gttgctttt	cggtagtggc	gatggccct	gcatgtctcc
3841	tcaccgtgg	atcggtacga	ctcgaaataa	cagaacacaaa	gtcaataaaag	tgaaaataaa
3901	taaaaatctt	tgaacaaatc	cgaaaaaggct	tggagtcttc	gtcccgatct	cttccccctg
3961	cgagcccttt	ttatggaga	aggaaaaaga	gaaaagagaa	tcgtttaaagg	gaacccggcg
4021	cccaagccagg	ctccagtggc	cggaaacgggg	cggcgaggggc	ggcgaggggc	ccgagggtccg
4081	gccccatccca	gtctctgtggg	gctggccggg	cagagacccc	ggaccccgac	ccagggctaa
4141	cctgtctaaat	gtccccggac	ggttctggtc	tctctggcca	ctttcagtgc	gtcggttctg
4201	tttatttttt	ttttttttgt	gcacataaga	aataataat	aataataat	aaagaataaa
4261	attttgtatg	tcaaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa			

42. SEC ID Nº: 42 (Gen de caja emparejada 2 (PAX2) de Homo sapiens, variante de transcripto d; REFERENCIA NM_003989)

MDMHCKADPFSAMHPGHHGVNQLGGVFVNGRPLPDVVRQRIVELAHQGVRPCDISRQLRVSHGCVSKILGRY
YETGSIKPGVIGGSKPKVATPKVVDKIAEYKRQNPTMFAWEIRDRLLAEGICDNDTVPVSINRIIRTKVQ
QPFHPTPDGAGTGTAPGHTIVPSTASPPVSSASNDPVGSYSINGILCIPRSNGEKRKRDEDVSEGSPVNGD
SQSGVDSLRKHLLRADTFTQQQEALDRVERPSYPDVFQASEHIKSEQNEYSLPALTGPLDEVKSSLAST
NPTELGSNVSGTQTYPVVTGRDMASTTLPGYPPHVPTGQGSYPTSTLAGMVGSEFSGNPYSHPQYTAYNEA
WRESNPALLMPPPGPPIPLLPLPMTATSYRGDHIKLQADSEGHLHIVPV

5

43. SEC ID Nº: 43 (Gen de caja emparejada 2 (PAX2) de Homo sapiens, variante de transcripto d; REFERENCIA NM_003989)

1 aggctccagt ctccggcaga gtcttctcgc agccgcaacc cacctggggc cagcccagag
 61 ctgcgcgcgc cgctcggttc cctccctccc tcceggccct tcggccgcgg cggcgctgcgc
 121 ctgcctttc cggggggcggg ggcctggccc gcgcgcctcc ctcggcagg cgccacctcg
 181 gacatccccg ggattgtctac ttctctgcca acttgccaa ctgcgcagca cttggagagg
 241 cccggctccc ctccccggcgc cctctgaccg ccccccggccc gcgcgccttc cgaccaccgc
 301 ctctcgatg accaggttcc aggggagctg agcgagtcgc ctcccccgcgc cagcttcagc
 361 cctggctgca gtcgcgcgc ggcctatgcg ccccccagtgc accccggccc ggcccacccgc
 421 cccggggccca ttctgtctgac cgcgcgcgc ctagccgcgc cactggcaag ttgcggctac
 481 tgcagtgtca agctccggcc aacccggagg agcccccgcgc gggagcgcag tggtgcgc
 541 cccgcgcgc cgcgcgcgc agcagccggg ctttactca tcccccgcgc cccacccgtcc
 601 ctcccctttc tcctcaagtc ctgaagttga gtttgagagg cgacacggcg gggcgcccg
 661 cgctgcctcc gtcctctgtc ctccccatgg atatgcactg caaaggcagac cccttcgc
 721 ctagtcaccc agggcacccggg ggtgtgaacc agctccgggg ggtgtttgtg aacggccggc
 781 ccctacccga cgtggtgaggc cagcgcacatcg tggagctggc ccaccagggt gtgcggccct
 841 gtgacatctc cccggcagctg cgggtcagcc acggctgtgt cagcaaaatc ctggcgagg
 901 actacgagac cggcagcatc aagccgggtg tgcgtggc ctccaaagccca aaagtggcga
 961 cgcggaaatg ggtggacaag attgtgaat acaaaacgaca gaaccggact atgttcgcct
 1021 gggagattcg agacccggctc ctggcccgagg gcatactgtga caatgcacaca gtgcggccgc
 1081 tctcttccat caacagaatc atccggacca aagttcagca gctttccac ccaacggccgg
 1141 atggggctgg gacaggaggta acggccctcg gccacacccat tggtcccgac acggccctccc
 1201 ctctgtttc cagccctcc aatgacccag tggatcccta ctccatcaat gggatccctgg
 1261 ggatttcgtc ctccaatggc gagaagagga aacgtgtatc agatgtgtct gagggctcag

1321 tccccaaatgg agatccccag agtgggtgtgg acagtttgog gaagcaattg cgagctgaca
1381 ccttcaccca gcagcagctg gaagcttgg atccgggtct tgagcttct tcctaccctg
1441 acgtttcca ggcatacgag cacatcaaat cagaacaggga gaacgagtac tcctccca
1501 ccctgacccc tgggcttcat gaagtcaagt cgagtctatc tgeatccacc aaccctgagc
1561 tggcagcaa cgtgtcaggc acacagacat acccagttgt gactggctgt gacatggcga
1621 gcaccactct gcttggttac ccccttcacg tgccccccac tggccaggga agtacccca
1681 cctccacccct ggcaggaatg gtgcctggga gegagttctc cggcaaccccg tacagccacc
1741 cccagtagacac ggcataaac gaggcttggaa gattcagcaa ccccgotta ctaatggcgc
1801 cccccggtcc gccccctggcg ctgtgtccgc tgcctatgac cgccactagt taccgggggg
1861 accacatcaa gcttcagggc gacagettcg gcttcacat cgtccccgtc tgacccccacc
1921 cggagggag ggaggacgca cggacgcga tgcctcccg ccaccggccc agcctcaccc
1981 catcccacga ccccccgaac ctttcacatc accccctctcg aaggctggac aggacgggtg
2041 gagccgtggg cgggaccctc aggccccggc cggccggccc cagccccggc tgcggccct
2101 ccccgccctgc ctggactcg cggccggctg aggggggatc gggccagctc gtccggccct
2161 ccaccaagcc agcccccaag cccggccagcc accctggccgg actcggccgc gactgtctgg
2221 cgcgeggcgg atgtttctgt gacacacaat cagcggggac cgcagcgggg cccagcccg
2281 ggcacccggc tggacgttc gggggccagg aggttctgt gggggggctg ggcacaggag
2341 attaagaaga aaacgacttt ctgcaggagg aagagccgc tgcggaaatcc ctggggaaaaaa
2401 ttcttttccc ccagtgcac cggactgac ctcgttccctec ggttgtgtcc tggcccaagaa
2461 gatggaatgg ggggtgtggg gteccggctt aggaaggggc ttggggggcg teagggtttt
2521 ccaagggttgg gacccaaagga tggggggggcc cagcagcccg caccatgaga gccggactct
2581 cgctttca ctgtccccc tggcctgcct agttccccag gggccggcac ctctctgtcc
2641 gagacccggc ttcagccct gccttgcctt taccttgcctg tttttccac ctgtgtggct
2701 cccagtttcc ctccttgcac gtccttcgc tgccttgc tgcctgtcat ctccttcct
2761 gacttcgcac cccatcgac gtcctcccg gacccggccca ggaccagttt ccatagactg
2821 cggaactgggg ttttcccca gcagttactt gatggccctt ccccegacac agactctcaa
2881 tctgggggtg gtaagaaccc gttctgagct ggcgtctgag ctgtgtggg gtggaaagtgg
2941 ggggctgccc actccactcc tcccatcccc tcccatgcctc ctctctccggc aggaactgaa
3001 cagaaccaca aaaagtctac atttatttaa batgtggtc tttgaaaaaaaa ggaacaaaac
3061 aacacaaaag cccaccagge tgetgtttt tggaaagacg gtgtgtgtcg tgtgaaggcg
3121 aaacccggtg tacataaeee ctccttcctcc gccccggcccc gccccggcccc gtagagttcc
3181 tgcggccccc cggccctgc tgttagatacg cccctgttc tgcgtgtga gagtcggccg
3241 tcgctggggg ggaagggggg gacacageta caegccccatt aaagcacacg acgttctggg
3301 ggaggggggc atttttatg ttacaaaaaaaaa aattacgaa agaaaagaaaa tctctatgca
3361 aatgacgaa catggtcctg tggacttcctc tggcctgttt tgggtgtct ttcctctgtaa
3421 ttccgtgttt tcgttttttc ctccttcgcctt ctcttccttc ctctcttc
3481 cttctctccc cctctgttc tgccttcctc cgtctctgtc gctttgtct gtctgtct
3541 gctttttctc cggccttcctc ccccaagacat ggcggccggcc cctctgttc cagggctaga
3601 tccgagggtg cagctccage cccccgggtcc gcccccttcgc ggggggtccccc egcggccccc
3661 gggccggccga aggccggggc gccccgtttcc gccccgttagt tgccttttcg gtatgtggga
3721 tgcggccccc tgcgtttccctc accctgttgat cgtgcacact cggaaataaca gaaacaaaatg
3781 caataaaatg aaaataaaaaa aaaaatcttg aacaatcccg aaaaagggtt gatgttcctgc
3841 ccagatctct ctccttcgtt cggccatccccc attttgcggcc aaaaagggtt gatgttcctgc
3901 gtttaaggga accccggcc cagccaggct ccagtggccc gaacggggcg gcgaggggcg
3961 cgaggccggcc gaggtccggc ccatcccgtt cctgtggggc tggccggggca gagacccccc
4021 acccaggcccc aggcctaacc tgctaaatgt cccctggacgg ttctgtgtct ctcggccact
4081 ttcaatgtcg tgggtttttt tgcattttttt tttttgtgtc acataagaaa taaaataataa
4141 taataaataaa agaataaaaaat tttgtatgtc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

44. SEC ID Nº: 44 (Gen de caja emparejada 2 (PAX2) de Homo sapiens, variante de transcripto e; REFERENCIA NM_003990)

MDMHCKADPFSAMPGHGVNQLGGVFVNGRPLPDVVRQRIVELAHQGVRPCDISRQLRVSHGCVSKILGRY
YETGSIKPGVIGGSKPKVATPKVVDKIAEYKRQNPTMFAWEIRDRLAEGICDNDTVPSVSSINRIIRTKVQ
QPFHPTPDGAGTGTAPGHTIPVSTASPPVSSASNDPGVGSYSINGILGI PRSNGEKKRKRDEVEVYTDPAHIR
GGGGLHLWWTLDVSEGSPNGDSQSQGVDSLRLKHRLADTFTQQOLEALDRVFERPSYPDVFQASEHIKSEQG
NEYSLPALTPGLDEVKSLSASTNPELGSNVSGTQTYPVVTGRDMASTTLPGYPPHPVPTQGGSYPTSTLAG
MVPGSEPSGNPYSHPOYTAYNRAWRFSNPALLMPPPGPPIPLIPLIPMTATSYRGDHIKLOADSFGHLIVPV

45. SEC ID Nº: 45 (Gen de caja emparejada 2 (PAX2) de Homo sapiens, variante de transcripto e; REFERENCIA NM_003990)

ES 2 390 083 T3

1 aggcctccagt ctccggggcga gtcttttcgtc agcccgaaacc cacctggggc cagccccagag
61 ctgcccacgcg cgcgtcggttc ctcccttccc tccggggccct tggggcgccgg cggcggtgcgc
121 ctgccttttc cggggggcggg ggcctggccc gcgcgcgtccctcccccgcagg cgccacctcg

181 gacatccccg ggattgtac ttctctgcca acttcgccaa ctgcgcagca cttggagagg
 241 cccggccccc ctcccggegc ctctgtaccg ccccgcccc gcgcgcgttc cgaccacccgc
 301 ctctcgatg accaggttc agggagatcg agcgagatcg ctccccccgc cagttcagc
 361 cctggctgca gctgcagcgc gagccatcg ccccgatgc accccgcccc ggccccacccgc
 421 cccggggccca ttctgtgac cggccaccc cgagccccga cagtggcaag ttggggctac
 481 tgcgttgca agtccgggg aacccggagg agccccagcg gggagcgca tggtggcc
 541 cccggccccg cgccggccgc agcagccccg egttactca ttcctccccc cccacacgtcc
 601 ctcccctttc tccctcaagtc ctgaagttga gtttgagagg cgacacggcg gggggggcc
 661 cgctgtcccc gctccctctgc ctccccatgg atatgcactg caaagcagac cccttctccg
 721 cgtgcacccc agggcacggg ggtgtgaacc agctggggg ggtgtttgt aacggccggc
 781 ccctacccga cgtgggtgagg cagccatcg tggagctgce ccaccagggt gtggggcc
 841 gtgacatctc cggcagatcg cgggtcagcc acggctgtgt cagccaaatc ctggggcagg
 901 actacgagac cggcagatc aagccgggtg tgatcggtgg ctccaagccc aaagtggca
 961 cggccaaatg ggtggacaag attgtcaat acaaacgaca gaacccgact atgttcgc
 1021 gggagattcg agaccggcgtc ctggccgagg gcatctgtga caatgacaca gtggccagcg
 1081 tctctccat caacagaata atccggacca aagttcagca gcttccac ccaacggccgg
 1141 atggggctgg gacaggatcg accggccctg gccacaccat tttttccagc acggccctccc
 1201 ctccctttc cagccctcc aatgaccatcg tggatctca tccatcaat gggatctgg
 1261 ggattccctcg tccaaatggt gagaagagga aacgtgtatg agttgaggt tacactgatc
 1321 ctggccacat tagaggatgt ggagggttgc atctggctcg gactttaaga gatgtgtctg
 1381 aagggtcagt ccccaatggg gattccaga gttgtgtgg cagtttgcgg aagcacttgc
 1441 gagctgacac cttcacccag cagcagatcg aagtttggg tcgggtctt gagcgtctt
 1501 cctacccgtg cgtttccag gcatcagac acatcaaatac agaacagggg aacgagact
 1561 cccctccaccc cttgaccctt gggttgcgt aagtcaagtc gacttataatc gatccacca
 1621 accctgagct gggcagcaac gtgtcaggca cacagacata cccagttgtg actggtotg
 1681 acatggcgag caccactcg ctgggttacc cccttcacgt gccccccact ggccaggaa
 1741 gctacccccc ctccacccctcg gcaaggatgg tgctctggag cgagtctcc ggcaacccgt
 1801 acggccaccc ccagttacacg gcttacaaacg aggcttggag attcagcaac cccgccttac
 1861 taatggggcc cccgggttccg cccgggttccg tgcgttgcgt gctatgaccc gggacttagt
 1921 acgggggggg ccacatcaag ttccagggcg acatgttgcg cttccacate gttcccgat
 1981 gaccccccaccc cggagggagg gaggaccgc gogacgcgt gcttccggc cccggcccc
 2041 gcttcacccccc atccacacac ccccgcaacc ttccacatca ccccccctcg aagttcgaca
 2101 ggacgggtgg aqccgtgggc gggaccctca qggccggggcc cgccggcccc agcccccgc
 2161 gccggccctc cccggcttgcg tggactgegc ggcggcgatgg gggggatcg gcccagatcg
 2221 tccggccctc caccacggca gccccggcgc cccggccggc ctggggccgg
 2281 acctgttgtc ggcggccggc tgttttgtg acacacaatac agcggggacc gcaagccggc
 2341 ccagccccgg gcaaccggcct cggacgtcg ggcggccagg ggcggccgtg ggggggttgc
 2401 gccaaggaga ttaagaagaa aacgacttgc tgcaaggagga agagcccgat gccaatccc
 2461 tggaaaaaat tttttttttt cagttccatcg cggactgccc tccgttccatcg ggtgtggcc
 2521 gtcggccatcg atggaatggg ggtgtggggg tccgggtcta ggaacgggtt ttgggggggt
 2581 cagggttcc caaggttggg acccaaggat cggggggccc agcggccgc accgtatcg
 2641 cggacttgc gcttccatcg tgcttccatcg ggcggccatcg tttttccagg gccggccacc
 2701 tccgtgtcg agacccggat ctcggccatcg tttttccatcg accttgcgtt tttttccacc
 2761 tgcgttgcctc ccagtttcc tccgttgcag tccgttgcct gtcgggttgc gccctgtatc
 2821 ctccctccatcg actcgccatcg ccatcgatcg ctccctccatcg accggccatcg gaccaggat
 2881 catagactgc ggactgggtt ctccctccatcg cagttacttg atggcccttc cccggccacca
 2941 gacttcaat ctggccgggtt taagaacggg ttctgatcg gctgttgcgc tgctgggggg
 3001 tggaaatggg ggggttgcctc ctccacttcc tccatccatcg cccagccctc tccgtggcc
 3061 ggaactgaac agaaccacaaa aaagtctaca tttttttat atgtgttgc ttggaaaaaaag
 3121 gaacaaaaaca acacaaaaggcc cccaccaggat gtcgtttgtt gggaaagacgg tttgtgtcg
 3181 gtgaaaggcgaa aacccgggtt acataaccc tcccccctccg cccggccccc cccggccccc
 3241 tagatccatcg tccggccatcg gggccctccatcg ttagatcgatcg cccggatcg tgcgtgtcg
 3301 agtgcgtatcg cgttgggggg gaaaggggggg acacatcgatcg acggccatcg aacccacac
 3361 cgttccgggg gggggggcc tttttttatgt tttttttttt aattacggaaa gaaaagaaaat
 3421 ctctatgcac aatgacgcac atgggttgcgt ggacttccatcg ggcggccatcg tttttttt
 3481 tccgtgtat tccgtgtttt cccgtttcc tccgtggccatcg tccgttccatcg tccgttccatcg
 3541 tccgttccatcg tccgttccatcg tccgttccatcg tccgttccatcg tccgttccatcg
 3601 tccgttccatcg tccgttccatcg ggcggccatcg cccagacatcg gccggccatcg cccgttccatcg
 3661 cagggtatcg cccggatcgatcg acgttccatcg cccggatcgatcg cccgttccatcg ggcgtggcc
 3721 ggcggccccc gggggccggaa ggcggccatcg cccggatcgatcg cccggatcgatcg gtcgttccatcg
 3781 tagtggatcg ggcggccatcg tccgttccatcg cccggatcgatcg gtcgttccatcg gtcgttccatcg
 3841 aaacaaaatcg aataaaatcg aaataaaataa aaatccatcg acggccatcg aacccatcg aaaaagagaa
 3901 agtccatcgatcg tcccttgcgtt ggcggccatcg tccgttccatcg tccgttccatcg
 3961 aagagaatcg tttttttttt cccggccatcg acgttccatcg cccggatcgatcg cccggatcgatcg
 4021 cggggccatcg gggggccatcg aggttccatcg tccgttccatcg tccgttccatcg
 4081 agacccggatcg cccggccatcg ggcggccatcg tccgttccatcg cccggatcgatcg tccgttccatcg
 4141 tccgttccatcg tccgttccatcg ggcggccatcg tccgttccatcg tccgttccatcg
 4201 aaataataat aataaaataa gaataaaaatt ttgtatgtca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

46. SEC ID Nº: 46

**ttcacccttgactgtggcacctccctcagttccgtcgacgaggttgtgcaatccaccagtcttataaaatac
agtgacgctccagcctctggaagcctgtca**

5 47. SEC ID Nº: 47

tcaagcgtactaattg
48. SEC ID Nº: 48
ACTGCCCATTGCCAAACAC
49. SEC ID Nº: 49
10 AAAATCTTGCAGCTTTCCCC
50. SEC ID Nº: 50
GTCGGTTACGGAGCGGACCGAG
51. SEC ID Nº: 51
TAACATATAG ACAAACG CACACCG
15 52. SEC ID Nº: 52
GCGCTTGTGTC GCCATTGTATT
53. SEC ID Nº: 53
GTCACACCACAGAAGTAAGGTTCC
54. SEC ID Nº: 54
20 GTCGGTTACGGAGCGGACCGAG
55. SEC ID Nº: 55
CACAGAGCATTGGCGATCTCGATGC
56. SEC ID Nº: 56
ACCCGACTATGTTCGCCTGG
25 57. SEC ID Nº: 57
AAGCTCTGGATCGAGTCTTG
58. SEC ID Nº: 58
ATGTGTCAGGCACACAGACG
59. SEC ID Nº: 59
30 GUCGAGUCUAUCUGCAUCCTT
60. SEC ID Nº: 60
GGAUGCAGAUAGACUCGACTT
61. SEC ID Nº: 61
TCAGCAGTGGAGGGCAATG
35 62. SEC ID Nº: 62
CCTCTGTAACAGGTGCCTTGAAT
63. SEC ID Nº: 63
ACAGCAAACCTCCTCACAGCC
64. SEC ID Nº: 64
40 TGGAGACGTGGCACCTCTTG
65. SEC ID Nº: 65
TATGATAACCCGGGAGATCGTGATC
66. SEC ID Nº: 66
GTGCAGATGCCGGTTCAGGTACTC
45 67. SEC ID Nº: 67
TCAGCCCTGGACTACCTGCA
68. SEC ID Nº: 68
GAGGTCCCGGTACACCACGT

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD MÉDICA DE CAROLINA DEL SUR
CARLTCN D. DONALD

5 <120> COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS PARA DIAGNOSTICAR, TRATAR Y PREVENIR
AFECCIONES DE PRÓSTATA

10 <130> 19113.0129P2

10 <150> 60/885.142

10 <151> 16-01-2007

15 <160>68

15 <170> Fast SEQ para Windows Versión 4. 0

20 <210>1

20 <211>5

20 <212>ADN

20 <213> Secuencia artificial

25 <220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética

30 <400> 1

30 cct t g 5

30 <210>2

30 <211> 21

30 <212>ARN

30 <213> Secuencia artificial

35 <220>

35 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética

40 <400> 2

40 auagacucga cuugacuuuc u 21

40 <210>3

40 <211>21

40 <212>ARN

40 <213> Secuencia artificial

45 <220>

45 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética

50 <400> 3

50 gagggaaacgu gaugaagauu u 21

50 <210>4

50 <211> 21

50 <212>ARN

50 <213> Secuencia artificial

55 <220>

55 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética

60 <400> 4

60 aucuucauca cguuuccucu u 21

60 <210>5

60 <211>21

60 <212>ARN

65 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400> 5
 ggacaagauu gcugaaauacu u 21

10 <210>6
 <211>21
 <212>ARN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400> 6
 guauucagca aucuuguccu u 21

20 <210>7
 <211>21
 <212>ARN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400> 7
 caucagagca caucaaauacu u 21

30 <210>8
 <211>21
 <212>ARN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400> 8
 gauuugaugu gcucugaugu u 21

40 <210>9
 <211> 20
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400> 9
 ctcccttcag ttccgtcgac 20

50 <210> 10
 <211> 20
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400> 10
 ct ccct t cac ct t ggt cgac 20

60 <210>11
 <211> 20
 <212>ADN

5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 10 <400> 11
 ct ccct t cac t ct ggt cgac 20
 <210> 12
 <211> 40
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400>12
 act gt ggcac ct ccct t cag 11 ccgt cgac gaggt t gt gc 40
 20 <210> 13
 <211> 40
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400>13
 act gt ggcac ct ccct t cac ct t ggt cgac gaggt t gt gc 40
 30 <210> 14
 <211> 40
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400>14
 act gt ggcac ct ccct t cac t ct ggt cgac gaggt t gt gc 40
 40 <210> 15
 <211>21
 <212>ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 50 <400>15
 gaagucaaguu cgagucuaauu u 21
 <210> 16
 <211>24
 55 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 60 <400> 16
 ccacccatgg caaaattccat ggca 24
 <210> 17
 <211>23

<212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400> 17
 ctcaggccta tgcaaaaaga gga 23
 10 <210> 18
 <211>23
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400> 18
 aacctacgca cctacgtgag gag 23
 20 <210> 19
 <211>20
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400> 19
 30 gacacctgag ctgaccctgg 20
 <210>20
 <211> 24
 <212>ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 40 <400> 20
 t ct agacggc aggt caggt c aacc 24
 <210> 21
 <211>20
 45 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 50 <400> 21
 gccct ccct c caaaggagac 20
 <210>22
 <211>22
 55 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 60 <400> 22
 cgt t cagt cc at cccat 11 c tg 22
 65 <210>23

<211>20
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400> 23
 gaggaagt cc agt gt ccagc 20
 10 <210>24
 <211> 20
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400> 24
 20 agaagt t cac cct t gact gt 20
 <210>25
 <211> 20
 <212>ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400> 25
 30 agaagt t cac gt t ccact gt 20
 <210>26
 <211> 20
 35 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 40 <400> 26
 agaagt t cac get ct act gt 20
 <210>27
 <211> 39
 <212>ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400> 27
 50 tt agegatt a gaagt t cacc ct t gact gt g gcacct ccc 39
 <210>28
 <211> 40
 <212>ADN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400> 28
 60 gt t agegat t agaagt t cac gt t ccact gt ggcacct ccc 40
 65

5 <210>29
 <211> 40
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400> 29
 gt t agegat t agaagt t cac get ct act gt ggcacct ccc 40
 15 <210>30
 <211>18
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400> 30
 cctggcaccc agcacaat 18
 25 <210> 31
 <211> 32
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400> 31
 gt t gcct gcc agt cgccat g agaact t cct ac 32
 35 <210>32
 <211> 20
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400> 32
 gcccgt ccac acggagt act 20
 45 <210>33
 <211> 32
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400> 33
 t ggcct t ccc t ct gt aacag gt gcct t gaa 11 32
 55 <210>34
 <211> 135
 <212>PRT
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400> 34

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

<210> 35

<211> 7331

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética

<220>

<221> mi sc_feature

<222> (0)...(0)

15 <223> n = a, c, g o t

<400> 35

ttcccccttt ccangaggc ct aat ccgt t ggcgcgcgc acgcggacac acacacacac 60
 acacacacac acacacacac acacacggcc cccat agcca cgcgaact ct cagcagcagn 120
 ncct agct cc t ct gacccga ggccccaaga cggccggcac aggaaccctt gggacgt cct 180
 ggct ccaggc tggacgt agg cggaggt ggc aggagt ggac aaaccaggc gggcccacg 240
 acgccccctt cct cgggt ct ct cct t gt tt cagccagccg ct ct cgcctt tggt cccctc 300
 ttccct gcgt taggtt cct t gt ct ccaggc cacct cgcag cct gt ccccg cct cggccgc 360
 cct gcccctt gggccct cccca gat ct ct ct g gccggt cccc ct gcctt acc agt cccggc 420
 t gt ggcgcgc tct t cgcctt g ct cct cacat ncacacagct gct gggagag gaggaaggaa 480
 aggccggncgc gccggggatg gat ccgagac ggt agat tt g gt gccggctc gcaaact ctg 540
 ggaaaactt aa ngcgggtt ct t ccccccctc t ncaact atg nccagcgcgg cccgt cgcg 600
 cgcgcctacc cccgggggac cctt cctt t cct gt attt cggct gccgc t glt t cgcctt 660
 cct ct ggt ct cccagccctt ggagt ggctt ccct gggccct gca ct ccgtt ccctt cggc 720
 cgcggccggc t gt cgcct gc cccccccctc cgcaggt ccc acggc cgcgg cggcgat gac 780
 t gt ggaggta acgcggggga cgt cct gggt cagctt gac cgt ct ccctc gaccacagcc 840
 cgtt gaggcc ggggcctccg gcccggctgc t aagagagt t aat cat t act tgcgcagcga 900
 cact cagctt cccctt ccga ct ct ct cggc cggctt aggg gaggagggga ggggacagct 960
 ggccaggt gg ggactt cggc t t cgcacaaa ccagccctt caggccctcc agagacaggt 1020
 ggt ggctt ct cagt t cccctc ggcaact ct c t aagg t cct t t t cct t cccc t cct gt ct ct 1080
 ccc t cct t cg agccctcc cagccaggcc t ct ccccaacc gct cct gt c cgc ct ggct 1140
 t t gact gatt aact gcaggc cctt gggagaa ccaactt ct t glt t ggaa ccggaccgga 1200
 cgggattt cc tccct aggt tcccgccaat gggccagctc ct cccgacgg ttt tggcggaa 1260
 ctggct gaag aggaccgcgc ctgaggccac aatt aaccctt gctgt tggt g tgggt ggt t g 1320

agt gccaaag	agaact gccc	aggct cccgc	aggagt gggg	acgt ccccg	ggtt tgcgcct
cct ggcgt cg	ccccggat cc	accgagct ag	caggggggg	cgct cagccg	cgt cccgagc
ct cct ct ct	ccccagccgg	ggagagccag	cct cgt ct cc	cacat cct ct	gcccgcagcg
acct gcagct	ccgcact gt t	t cccct cccct	gt acccccct	cccagt cacc	cgagggt t ca
gaaaccaagt	ccccggct c	t cccgcat c	cgct gggt cc	caccgaggca	ggt gggt act
cgccggaggt	ct t caget cg	at t ct gaacc	aagcgt t ct g	gact gcccag	acccgg t ggg
caaggggact	ggggaggccc	t gogcacagt	cgcg t ggaac	gggaggggac	aagacaact
gct ggacact	ttt ccgt gga	at gagaagt g	gggggt gctt	gggt gggaaag	gt actt ccgg
agggaaaaggc	caaagggaag	gaccagaaag	agaggaagga	agagccggga	aggaacggaa
gggaaact cag	agccgggggt	gggt ggggt tg	gggcgt aggga	t ggcacttg	gccccgggccc
gcggggccca	ggccgggact	ggccagtt gga	t ggccagggt	ggccgagtt a	gaact gagag
ccccggct ca	cagcgcagcg	cgctt ccgggg	ccct ct gicg	t acct gaat	att cat t aga
c t gaccgt c	ttt at cctt a	t ct aacgt tt	at ct t at cgg	cgagtt t cgt	t t ct cagt gt
agttttatc	ccgggct ccc	at t cccct c	ccccggct cgg	ct cccct ccc	t cccct t tcc
t t cggccgt	gct cccct ccc	t cccct cccct	ccat t ct cc	ct cccct gcc	ct cccct t gc
ccgcacccga	gt gacaggct	cgggggccct c	ct cggccgaag	ct cgggggt c	cagcgt ggc
gaat cacaga	gt ggt ggaat	ct at t gcct t	t gt ct gacaa	gt cat ccat c	t cccggcgcg
gggagggggg	ggaggt ct gg	agggggctt	gcagct t t a	gagagacaca	cacccgggagc
cgaggct cca	gt ct cggccc	gagt ct t ct a	gcagccgcaa	cccacct ggg	gccagcccaag
agct gcccag	gcccgt cggc	t cccct cccct	cct cccggcc	ct t cggccgc	ggcggcgt gc
gcct gcccct	t cccggggcgg	ggggccct ggc	ccggccgcctc	ccct cccgca	ggcggccacct
cgacat ccc	cggtt t gct	act t ct ct gc	caact t cgcc	aact cggcag	cact t ggaga
ggcccggt c	ccccccggcc	gcct ct t gac	cgccccccgccc	ccgcgcgt c	t cggaccacc
gcct ct cggg	t gAACAGGT	ccaggggggc	t gagcggagt c	gcct cccccccg	cccagct t ca
gcctt ggct g	cagct gca	gctgagccat g	cgccccccagt	gcaccccccgc	ccggccccacc
gccccggggc	catt ct gct g	accggccatc	cccgagcccc	gacagt ggca	agt t ggggt
act ggggt g	caagct cggg	ccaacccgga	ggagccccag	ccggggagcc	agt gt t ggc
ccccccggccc	cgcgccgcgc	gcagcaggcg	ggcgt t cact	cat cct cccct	ccccccacgt
ccct cccct t	t ct cctt caag	t cctt gaagtt	gagt t t gaga	ggcgcacacgg	cgccggcgcc
cgcgct gct c	ccgcct cct ct	gcctt cccat	ggat at gcac	t gcaaaggcag	accctt ct c
cgcgat gca	cgt gagt acc	cgccggccggc	t cctt gt cccg	gct cgggcgt c	t ccgt cccaa
ccct gt ccag	t				7320
					7331

<210>36

<211> 416

5 <212>PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética

10

<400> 36

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

Ile Pro Arg Ser Asn Gly Glu Lys Arg Lys Arg Asp Glu Val Glu Val
 195 200 205
 Tyr Thr Asp Pro Ala His Ile Arg Gly Gly Gly Leu His Leu Val
 210 215 220
 Trp Thr Leu Arg Asp Val Ser Glu Gly Ser Val Pro Asn Gly Asp Ser
 225 230 235 240
 Gln Ser Gly Val Asp Ser Leu Arg Lys His Leu Arg Ala Asp Thr Phe
 245 250 255
 Thr Gln Gln Gln Leu Glu Ala Leu Asp Arg Val Phe Glu Arg Pro Ser
 260 265 270
 Tyr Pro Asp Val Phe Gln Ala Ser Glu His Ile Lys Ser Glu Gln Gly
 275 280 285
 Asn Glu Tyr Ser Leu Pro Ala Leu Thr Pro Gly Leu Asp Glu Val Lys
 290 295 300
 Ser Ser Leu Ser Ala Ser Thr Asn Pro Glu Leu Gly Ser Asn Val Ser
 305 310 315 320
 Gly Thr Gln Thr Tyr Pro Val Val Thr Gly Arg Asp Met Ala Ser Thr
 325 330 335
 Thr Leu Pro Gly Tyr Pro Pro His Val Pro Pro Thr Gly Gln Gly Ser
 340 345 350
 Tyr Pro Thr Ser Thr Leu Ala Gly Met Val Pro Gly Ser Glu Phe Ser
 355 360 365
 Gly Asn Pro Tyr Ser His Pro Gln Tyr Thr Ala Tyr Asn Glu Ala Trp
 370 375 380
 Arg Phe Ser Asn Pro Ala Leu Leu Ser Ser Pro Tyr Tyr Tyr Ser Ala
 385 390 395 400
 Ala Pro Arg Ser Ala Pro Ala Ala Ala Ala Ala Ala Tyr Asp Arg His
 405 410 415

<210> 37

<211> 4276

5 <212>ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética

aggctccagt	ctccggccga	gtcttctcgc	agccgcaacc	cacctgggc	cagcccagag	60
ctgccagcgc	cgctcggtc	ccctccctccc	tccccggccct	tccggccgcgg	cggegtgcgc	120
ctgcctttc	cgggggcggg	ggcttgccc	gcccgtccc	ctcccgcaagg	cgccacactcg	180
gacatccccg	ggattgtac	ttctctgcga	acttcgccaa	ctcgccagca	cttggagagg	240
ccccggctcc	ctcccgccgc	cctctgaccg	ccccggcccc	gcccgtctc	cgaccaccgc	300
ctctcggtat	gaccaggatcc	aggggatgt	agcgatcgc	ctccccggcc	cagettcagc	360
ccctggctgca	gtcgagcgc	gagccatg	cccccaagtgc	acccggccccc	ggccaccgc	420
ccccggggcca	ttctgtgtac	cgccccagccc	cgagggccga	cagtggcaag	ttggccgtac	480
tgcagttgtca	agctccggcc	aacccggagg	agccccagcg	gggagcgcag	tgttgcgccc	540
ccccggccccc	cgccccccgc	agcagccggg	cgttcatca	tcctccctcc	cccacccgtcc	600
ctcccttttct	tcccaagtct	ctgaagttga	gtttgagagg	cgacacggcg	gcggggcccg	660
cgctgtctcc	gtctctctgc	ctccccatgg	atatgcactg	caaaggcagac	cccttctccg	720
cgatgcaccc	agggcacggg	ggtgttaacc	agctccccgg	ggtgttgtgt	aacggccggc	780
ccctaccgcga	cggtgttggg	cagcgtatcg	tggagctggc	ccaccagggt	gtgcggccct	840
gtgacatctc	ccggcagctg	cggtttagcc	acggctgtgt	cagcaaaatc	ctgggcaggt	900
actacggagac	cggcagcatc	aagccgggtg	tgtatcggtgg	ctccaaggccc	aaagtggcga	960
cgcccaaagt	ggtggacaag	attgtgttttt	acaaacgaca	gaacccggact	atgttgcgtt	1020
ggggagattcg	agaccggctc	ctggccgagg	gtatctgtgt	caatgacaca	gtgccccagcg	1080
tctcttccat	caacagaatc	atccggacca	aagttcagca	gcctttccac	ccaacggccgg	1140
atggggctgg	gacaggatgt	acccggccctg	gccacacccat	tgttccccage	acggccctccc	1200
ctccgttttc	cagcgccctcc	aatgaccctg	tgggatccta	ctccatcaat	gggatctgg	1260
ggatttcttcg	ctccaaatgtt	gagaagagga	aacgtgtatg	agttaggtat	tacactgttc	1320
ctggccacat	ttagggatgt	ggagggtttgc	atctggctgt	gacittaaagaa	gatgtgtctg	1380
agggctcgtt	ccccaaatgga	gatttccctaga	gtggtgttgg	cagtttgcgg	aagcacttgc	1440
gagctgacac	cttcccccag	cagcgttgg	aagcttttgg	tccggctttt	gagcgtccct	1500
cctaccctga	cgctttccag	gtatcagac	acatcaaata	agaacagggg	aacgagtact	1560
ccctcccaagc	cctgaccctt	gggtttgtatg	aagtcaagt	gagttatctat	gtatccacca	1620
accctgactt	gggcagcaac	gtgtcaggca	cacagacata	cccaagtgtg	actggtcgtg	1680
acatggcgag	caccactctg	cctggttacc	ccccctcacgt	ggcccccact	ggccaggaa	1740

gct accccac ct ccacccct g gcaggaat gg t gcct gggag cgagt t ct cc ggcaaccgt 1800
 acageccaccc ccagt acacg gcct acaaag aggct t ggag at t cagcaac cccgcct t ac 1860
 t aagt t cccc t t att at t at agt gcccgc cccggt ccgc ccct gcccgt gct gcccgt g 1920
 cct at gaccg ccact agt t a ccgcggggac cacat caagc t t caggccga cagct t cggc 1980
 ct ccacat cg t ccccgt ct g accccacccc ggaggaggagg aggaccgacg cgacgcgt g 2040
 cct cccggcc accggccccag cct cacccca t cccacgacc cccgcaaccc t t cacaat cac 2100
 cccctt cggaa ggt cggacag gacgggt gga gcccgt gggcg ggacctt cag gccccggccc 2160
 gcccggccca gccccgcct g ccgcctt cc ccgcct gcct ggact gcgcg gcccgt gag 2220
 ggggat t cgg cccagct cgt cccggect cc accaagccag cccgcaaggcc cgccagccac 2280
 cct gcccggac t cggcgcga cct gct gggc gcgccggat gt t ct gt ga cacacaat ca 2340
 ggcgggaccc cagcggggcc cagccccggg caccgcct c ggacgt cgg ggcgcaggag 2400
 gct t cgct gg agggct ggg ccaaggagat t aagaagaaa acgact t t ct gcaggaggaa 2460
 gagcccgct g ccgaat ccct gggaaaaatt t ttttcccccc agt gccagcc ggac t cccct 2520
 cgcct t cccg gt gt gcccgt t cccagaaga t ggaat gggg gt gl gggggt cccgct t ag 2580
 gaacgggct t ggggct c aggt ct t cc aaggt t gggc cccaaaggat c ggggggccc 2640
 gcagcccgca ccgt cgago cggact ct cg gcctt cact gcctt cct g gcct gcct ag 2700
 t ccccgagg cccggcacct cct gct gcca gaccggct c t cagccct gc ct t cccct a 2760
 cct cagcgt c t ct t ccacct gct ggcct cc cagtt t cccc t cct gccagt cct t cccct g 2820
 t cccct t acg ccct geat cc t cct ccct ga ct cgcagccc cat cggacgc t ct cccggga 2880
 cccggcagg accagt t t cc at agact gcg gacgggt c t cct ccage agt t act t ga 2940
 t gccccct cc cccgacacag act ct caat c t gcccgt ggt aagaacccgt t ct gagct gg 3000
 cgt ct gagct gct gccccgt ggaagt gggg ggct gcccac t cact cct c ccat cccct c 3060
 ccagcc t ct cct ccggcag gaact gaaca gaaccacaaa aagt ct acat tt ait aat a 3120
 t gat ggt ct t t gaaaaagg aacaaaacaa cacaaaagcc caccaggct g ct gct t gt g 3180
 gaaagacggt g t gt gt cgt g t gaaaggcga aaccgggt t a cat aaccct cccct ccgc 3240
 cccgcccccc cccggccctt agagt cccct g t cgcggccg gcccgt gct t agat acgcc 3300
 cccgt ct ct g t gct gt gaga g t cgcgt c gct ggggggg aaggggggga cacagct aca 3360
 cggccat t aa agcacagcac g t cct ggggg agggggcat tttt at gtt aaaaaaaaaa 3420
 at t acgaaag aaaagaaaat c t ct at gaaa at gacgaaca t ggt cct gt g gact cct ct g 3480
 gcct gt t t g t ggct ct t t ct ct gt aat t ccgt gt t t c gct t t t cct cccct gcccct 3540
 ct ct ccct ct gcccct ct ct cct ct ccgt t ct ct ccccccc t ct gt ct ct g t ct ct ct ccg 3600
 t ct ct gt cgc t ct t ct gt ct gt ct ct g t ct t ct cc gct cccct ccagacgt gg 3660
 cccggccggc ct gt ct ccgc aggt agat c cgagg t ggc a gct ccagcc cccggct cgc 3720
 cccct cgcgg gct gccccg cgcggccccc gccccgcaag gccccggccccc cccgt cccgc 3780
 cccgt agt t g ct ct t cgg t agt ggccat g cccct gcat gt ct cct cac cccgt ggat cg 3840
 t gacgact cg aaat aacaga aacaaagt ca at aaagt gaa aat aaat aaa aat cct t gaa 3900
 caaat ccgaa aaggct t gga g t cct cgc cc agat ct ct ct cccct gggag cccct t t t at 3960
 t t gagaagga aaaagagaaa agagaat cgt t t aagggaac cccggcccca gccaggct cc 4020
 agt ggcccgaa acggggccgc gagggccggc agggccggca ggt ccggcccc at cccag t cc 4080
 t gt ggggct g gcccggcaga gacccggac ccaggcccag gct t aacct g ct aaat gt cc 4140
 cccggacggt t ct ggt ct cct cggccact t t cagt gct gtc g t ct gtt t g at t ct t t c 4200
 t t t g t gac at aagaaat a aat aat aat a at aaat aaag aat aaaat t t g t at gt caa 4260
 aaaaaaaaaa aaaaaaa 4276

<210> 38

<211> 393

5

<212>PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética

10

<400> 38

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

115 120 125
 Val Pro Ser Val Ser Ser Ile Asn Arg Ile Ile Arg Thr Lys Val Gln
 130 135 140
 Gln Pro Phe His Pro Thr Pro Asp Gly Ala Gly Thr Gly Val Thr Ala
 145 150 155 160
 Pro Gly His Thr Ile Val Pro Ser Thr Ala Ser Pro Pro Val Ser Ser
 165 170 175
 Ala Ser Asn Asp Pro Val Gly Ser Tyr Ser Ile Asn Gly Ile Leu Gly
 180 185 190
 Ile Pro Arg Ser Asn Gly Glu Lys Arg Lys Arg Asp Glu Asp Val Ser
 195 200 205
 Glu Gly Ser Val Pro Asn Gly Asp Ser Gln Ser Gly Val Asp Ser Leu
 210 215 220
 Arg Lys His Leu Arg Ala Asp Thr Phe Thr Gln Gln Gln Leu Glu Ala
 225 230 235 240
 Leu Asp Arg Val Phe Glu Arg Pro Ser Tyr Pro Asp Val Phe Gln Ala
 245 250 255
 Ser Gln His Ile Lys Ser Glu Gln Gly Asn Glu Tyr Ser Leu Pro Ala
 260 265 270
 Leu Thr Pro Gly Leu Asp Glu Val Lys Ser Ser Leu Ser Ala Ser Thr
 275 280 285
 Asn Pro Glu Leu Gly Ser Asn Val Ser Gly Thr Gln Thr Tyr Pro Val
 290 295 300
 Val Thr Gly Arg Asp Met Ala Ser Thr Thr Leu Pro Gly Tyr Pro Pro
 305 310 315 320
 His Val Pro Pro Thr Gly Gln Gly Ser Tyr Pro Thr Ser Thr Leu Ala
 325 330 335
 Gly Met Val Pro Gly Ser Glu Phe Ser Gly Asn Pro Tyr Ser His Pro
 340 345 350
 Gln Tyr Thr Ala Tyr Asn Glu Ala Trp Arg Phe Ser Asn Pro Ala Leu
 355 360 365
 Leu Ser Ser Pro Tyr Tyr Ser Ala Ala Pro Arg Ser Ala Pro Ala
 370 375 380
 Ala Ala Ala Ala Ala Tyr Asp Arg His
 385 390

<210>39

<211>4207

5

<212>ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética

10

<400> 39

aggctccagt ctccggccga gtcttctcg agccgcAACc caccctgggc cagcccAGAG 60
 ctgccAGGCGC cgctccggctc cctccctccc tccccggccct tcggccGGGG cggcgTgcgc 120
 ctgccttttc cgggggggggg ggcctggccc gegegetccc ctcccgagg cgccaccccg 180
 gacatccccg ggatgtgtac ttctctggca acttgcggaa ctgcggca cttggagagg 240
 cccggctccc ctccccggcgc cctctgaccg ccccccggcc ggcgcgttc cggaccacgc 300
 ctctcggtgg accagggtcc agggggagctg aegagtgcc ctccccggcc cagcttcagc 360
 cctggctgca gctgcAGGCGC gagccatgCGC ccccccAGtGC accccggccc ggccaccgc 420
 cccggggccat ttctgtgtac cggccAGGCC cggagccccga cagtggcaag ttggcgtaac 480
 tgcatgtca agctccggcc aacccggagg agcccgagcg gggagcgccag tggcgccccc 540
 cccggccccccg cgcggccccgc agcagccggg cgttcaatca tccctccctcc cccaccgtcc 600
 ctcccctttc tcccaaaatc ctgaatgtga ttgttggagg cggacacggcg gggcgcccg 660
 cgctgttccc gctctctgtc ctccccatgg atatgtactg caaaggAGAC cccttcctcc 720
 cgatgcaccc agggcacggg ggtgtgaacc agctcggggg ggtgtttgtg aacggccggc 780
 ccctaccgca cgtgttgggg cagcgcatcg tggagctggc ccaccagggt gtggggccct 840
 gtgacatctc cccggcAGCTG cgggtttagcc acggctgtgt cagaaaaatc ctggcagg 900
 actacggagac cggcagcatc aaggccgggtgtg tggatgggg ctccaaagccc aaagtggaga 960
 cggcccaaagt ggtggacaag attgtgtgttcaaaacgaca gaaccccgact atgttcggct 1020
 gggagattcg agacccggctc ctggccggagg gcatctgttga caatgacaca gtggccagcg 1080
 tctcttccat caacagaatc atccggacca aagttcagca gcctttccac ccaacggccgg 1140
 atggggctgg gacaggatgt accggccctgt gcccacccat ttgttcccgac acggctccc 1200
 ctccctgtttc cagcgccctcc aatgaccctg tggatcttca ctccatcaat gggatccgg 1260
 ggatttccatcg ctccaaatggt gagaagagga aacgtgtatga agatgtgtct gagggctcag 1320

tcccccaat gg	agat t cccag	agt ggt gt gg	acagt tt gcg	gaaggact t g	cgagct gaca	1380
cc t cacca	gcagcagct g	gaagct t t gg	at cgggt ct t	t gagcgt cct	t ct accct g	1440
acgt ct t cca	ggcat cagag	cacat caaat	cagaacaggg	gaacgagt ac	cccccccag	1500
ccct gaccgg	t gggct t gat	gaagi caagt	cgagt ct at c	t gcat ccacc	aacct gage	1560
t gggcagcaa	cgt gt caggg	acacagacat	accct agt gt	gact ggt cgt	gacat ggcga	1620
gcaccact ct	gcc t ggt t ac	ccccct cacc	t gccccccac	t gggcaggga	agct acccca	1680
cc t ccaccc	ggcaggaaat g	gt gcct ggg	gcgagt t ctc	cggcaacccg	t acagccacc	1740
cccagt acac	ggct acaac	gaggct t gga	gat t cagcaa	ccccgcct t a	ct aaat t ccc	1800
ct t att t t a	tagt gccc	ccccgtt ccg	ccccct gccgc	t gct gccgct	gcct at gacc	1860
gccact agt t	accggggga	ccacat caag	ct t caggccg	acagct t cgg	cct ccacat c	1920
gt t cccgt ct	gaccggcaccc	cgaggggagg	gaggaccgac	gcgacgcat	gcct cccggc	1980
cacccggccca	gcct caccgg	at cccacagac	cccccaacc	ct t cacat ca	ccccct cga	2040
aggt cgga	ggacgggt gg	agccgtt ggg	gggaccc t ea	ggcccccggcc	cgcccccggcc	2100
agccccggct	ggcccccct c	ccccgtt gcc	t ggact gcgc	ggcggcgiga	ggggat t cg	2160
gcccagct cg	t cccggccct c	caccaagcca	gccccgaagc	ccggccagcca	ccct gccggg	2220
ct cggggcg	acc t gtt ggc	gwgccggta	t gt t t ct g	acacacatac	agcggggacc	2280
gcagcggggc	ccaggccccgg	gcacccggct	ggcggcgt cg	ggcggcaggaa	ggct t cgct g	2340
gagggggct gg	gccaaggaga	tt aagaagaa	aacgact t t c	t gcaaggagga	agagccccgt	2400
gccgaat ccc	t gggaaaaat	t ct t t ccc	cagt gccagc	cgact gcct	t cgct t cgg	2460
ggt gt gccc	gt tccagaag	at ggaat ggg	gt t ggggg	t cccggct t a	ggaacgggct	2520
t t gggggct	cagg t ct t c	caaggt t ggg	acccaaggat	ggggggggccc	agcagccccc	2580
accgat cgag	ccggact ct c	ggct ct t cac	t gct cct cct	ggcct gcct a	gt t cccagg	2640
gccccgggeacc	t cct gct ggc	agacccggct	ct cagccct g	ct t gcccct	accc t cagcgt	2700
ct ct t ccacc	t gct ggct t c	ccagtt t ccc	ct cct gccag	ct t ccc t cgcct	gt t ccc t gac	2760
gccc t gca t c	ci ccc ccc t g	aci cgcagcc	ccat cggacg	ct ct cccggg	accggccgag	2820
gaccagtt t c	cat agact gc	ggactt ggggt	t ct cct ccag	cagt t act t g	at gccccct c	2880
ccccgacaca	gact ct caat	ct gccgg t gg	t aagaacccg	t t ct gagct g	gct t gac	2940
t get ggggg	t ggaagt ggg	gggt t gccca	ct ccact cct	cccat cccct	ccca gct cc	3000
t cct ccggca	ggaact gaac	agaaccacaa	aaagt ct aca	t t at t aat	at gat ggt ct	3060
t t gaaaag	gaacaaaaca	acacaaaagc	ccacccaggct	gt t ct t gt	gaaaagacgg	3120
t gt gt gt cgt	gt t gaggcga	aacccgg t gt	acat aacccc	t cccccc t cccg	ccccccccc	3180
ccccggcccg	t aggt t ccc	gt cccccc	gcccctt gct	gt agat acgc	cccgct t gct	3240
gt gct gt gag	agt t cccgc	cgctt ggggg	gaaggggggg	acacagct ac	acgcccatt a	3300
aaggcacagca	cgt ct t ggg	gagggggggca	t t t t t at gt	t acaaaaaaaa	aat t acgaaa	3360
aaaaagaaaat	ct ct at gcaa	aat gacgaac	at ggt cct gt	ggact cct ct	ggcct gt t t	3420
gt t ggct ct t	t ct ct gt aat	t ccgt gt t t	cgct t t t cc	t cct gcccc	t ct t cccct c	3480
t gccccct ct c	t cct ct ccc	t t ct t ccc	ct ct gt ct ct	gt ct ct ct cc	gt ct ct gt cg	3540
cct t gt ct g	t ct gt ct ct g	t ct t t ccc	ggcct ct ct c	ccca gacct g	gccccggccg	3600
cc t gt ct ccg	caggct agat	ccgagggt ggc	agct ccagcc	ccccggct t cg	ccccct cccg	3660
ggcgt gcccc	ggcggccccgg	ggcggccgaa	ggccggccg	ccccgt t cccg	ccccgt agt t	3720
gt ct t t cgg	t agt ggcgt	ggccctt gca	ccctt ggat c	gt gacgact c	gt gacgact c	3780
aaaaat aacag	aaacaaaat c	aat aagt ga	aaat aaat aa	aaat cc t t g	acaat ccga	3840
aaaggct t gg	agt ct ccc	cagat ct t c	t cccctt gega	gccccctt t t a	tt t gagaagg	3900
aaaaaagaaa	aaagagaat cg	t t aaggaa	cccgccgccc	agccaggct c	caggccccg	3960
aacggggccgg	cgaggccggc	gagggcccg	agg t cccggc	cat cccagtc	ct t gggggct	4020
ggccggccgg	agacccggca	cccaggccca	ggctt aaccct	gt t aaat gt c	cccgacgggt	4080
t ct ggt ct cc	t cggccac t	t cag t gct c	ggt t cgt t t t	gat t ct t t t	tt t t gt gca	4140
cat aagaat	aaat aat aat	aat aat aaa	aat aaaaat t	t t gt at gt ca	aaaaaaaaaaa	4200
aaaaaaaaa						4207

<210>40

<211> 396

5

<212>PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética

10

128 12

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

65 70 75 80
 Gly Val Ile Gly Gly Ser Lys Pro Lys Val Ala Thr Pro Lys Val Val
 85 90 95
 Asp Lys Ile Ala Glu Tyr Lys Arg Gln Asn Pro Thr Met Phe Ala Trp
 100 105 110
 Glu Ile Arg Asp Arg Leu Leu Ala Glu Gly Ile Cys Asp Asn Asp Thr
 115 120 125
 Val Pro Ser Val Ser Ser Ile Asn Arg Ile Ile Arg Thr Lys Val Gln
 130 135 140
 Gln Pro Phe His Pro Thr Pro Asp Gly Ala Gly Thr Gly Val Thr Ala
 145 150 155 160
 Pro Gly His Thr Ile Val Pro Ser Thr Ala Ser Pro Pro Val Ser Ser
 165 170 175
 Ala Ser Asn Asp Pro Val Gly Ser Tyr Ser Ile Asn Gly Ile Leu Gly
 180 185 190
 Ile Pro Arg Ser Asn Gly Gu Lys Arg Lys Arg Asp Glu Asp Val Ser
 195 200 205
 Glu Gly Ser Val Pro Asn Gly Asp Ser Gln Ser Gly Val Asp Ser Leu
 210 215 220
 Arg Lys His Leu Arg Ala Asp Thr Phe Thr Gln Gln Gln Leu Glu Ala
 225 230 235 240
 Leu Asp Arg Val Phe Glu Arg Pro Ser Tyr Pro Asp Val Phe Gln Ala
 245 250 255
 Ser Glu His Ile Lys Ser Glu Gln Gly Asn Glu Tyr Ser Leu Pro Ala
 260 265 270
 Leu Thr Pro Gly Leu Asp Glu Val Lys Ser Ser Leu Ser Ala Ser Thr
 275 280 285
 Asn Pro Glu Leu Gly Ser Asn Val Ser Gly Thr Gln Thr Tyr Pro Val
 290 295 300
 Val Thr Gly Arg Asp Met Ala Ser Thr Thr Leu Pro Gly Tyr Pro Pro
 305 310 315 320
 His Val Pro Pro Thr Gly Gln Gly Ser Tyr Pro Thr Ser Thr Leu Ala
 325 330 335
 Gly Met Val Pro Glu Ala Ala Val Gly Pro Ser Ser Ser Leu Met Ser
 340 345 350
 Lys Pro Gly Arg Lys Leu Ala Glu Val Pro Pro Cys Val Gln Pro Thr
 355 360 365
 Gly Ala Ser Ser Pro Ala Thr Arg Thr Ala Thr Pro Ser Thr Arg Pro
 370 375 380
 Thr Thr Arg Leu Gly Asp Ser Ala Thr Pro Pro Tyr
 385 390 395

<210> 41
 <211> 4290
 <212>ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética

ES 2 390 083 T3

aggct ccagt	ct cccggccga	gt ct t ct cgc	agccgcaacc	cacct ggggc	cagcccagag	60
ct gccagcgc	cgct cggc t c	cct ccct ccc	t cccggccct	t cggccgcgg	cggcgt gcgc	120
ct gcct t t c	cgggggggggg	ggcct ggccc	gegcgct ccc	ct cccgcagg	cgccacct cg	180
gacat ccccc	ggat t gct ac	t t ct ct gcca	act t cgccaa	ct cgccagca	ct tggagagg	240
cccggttccc	ct cccggcgc	cct ct gaccg	ccccggccca	ggcgcgt ttc	cgaccaccgc	300
ct ct cggat g	accagggtcc	aggggagctg	agcagat cgc	ct ccccccgc	cagct t cagc	360
cct ggct gca	gct gcagcgc	gagccat gcg	cccccaat gc	accccccggcc	ggcccccaccgc	420
cccgggggca	tt ct gct gac	cgccccagccc	cgagccccga	cagt ggcaag	tt gcccgt ac	480
tgcagt t gca	agct cccggcc	aacccggagg	agcccccagcg	gggagcgcag	t gt t gccc	540
cccgcccccg	cgcgcggccgc	agcagccggg	cgt t caci ca	t cct ccct cc	cccaccgt cc	600
ct cccct t t t c	t cct caagt c	ct gaagt tga	gt t t gagagg	cgacacggcg	gcggcgcccg	660
cgct gct ccc	gct cct ct gc	ct ccccaat gg	at at gcact g	caaagcagac	ccct t ct ccg	720
cgat gcaccc	agggcaeggg	ggt gt gaacc	agct cggggg	ggt gtt gt g	aacggccggc	780
ccct acccga	cgt ggt gagg	cagcgcattcg	t ggagct ggc	ccaccaggt	gt gcccct	840
gt gacat t c	ccggcagctg	cgggt cagcc	acggct gt gt	cagcaaaat c	ct gggcaggt	900
act aegagac	cggcagcat c	aagccgggt g	t gat cggt gg	ct ccaaggccc	aaagt ggca	960

cgcccaaagt ggt ggacaag att gct gaat acaaacgaca gaaccgcact at gtt cgcct 1020
 gggagatt cg agacccgc t c tggccgagg gcat ct gt ga caat gacaca gt gcccagcg 1080
 t ct ct tccat caacagaat c at ccggacca aagt t cagca gcct t ccac ccaacgcggg 1140
 at ggggcgt gg gacaggagt g accggccct g gccacaccat t gtt cccagc acggcct ccc 1200
 ct cct gt t tc cagccct cc aat gacccag t gggat cct a ct ccataat gggat cct gg 1260
 ggat t cct cg ct ccaat ggt gagaagagga aacgt gat ga agat gt gt ct gagggct cag 1320
 t ccccaat gg agat t cccag agt ggt gt gg acagt t t gtc gaaagact t g cgact gaca 1380
 cct t caccca gcaggcgt g gaagct t gg at cgggt ct t t gacgt cct t cct accct g 1440
 acgt ct t cca ggcatt cagag cacat ccaa t cagaacagg gaaacgagt ac t ccc t cccag 1500
 ccct gaccc t gggct t gat gaagt caagt cgact ct at c t gcat ccacc aaccct gage 1560
 t gggcagcaa cgt gt caggg acacagacat acccagt t gt gact ggt cgt gacat ggaga 1620
 gcaccact ct gccgg t ac cccct cacc t gccccccac t gggccaggga agct acccca 1680
 cct ccaccc t ggcaggat g gt gct gagg t cggat t gg t cct cat cc t ccc t cat ga 1740
 gcaaggccgg gaggaaat t gcaaggat gc cccct t gt gt gcaacccact ggaggcgt t 1800
 ct cggcaac cggt acaccc accccat a caccgt ac aacgaggt t ggat t cag 1860
 caacccccc tt act aagt t cccct at t a tt at agt gcc gccccccgtt cccct gc 1920
 cgct gct gcc gct gct at g accggcact a gt t accggcg ggaccacat c aagct t cagg 1980
 ccgacagct t cggcct ccac at cgt ccccg t ct gacccca ccccgagggg agggaggacc 2040
 gacgacgc gat gct ccc ggcaccggc ccagct c ac cccat cccac gaccccccga 2100
 accct t caca t caccct cgaagg t cgg acaggacggg t ggagccgt g ggcgggacc 2160
 t caggccccg gcccggccccc cccagccccg cct gccggcc ci ccccgctt gct ggact g 2220
 cgcggcgcgg t gaggggat t cggccct cgt t cccggc ci ccaccaag ccagcccg 2280
 agcccgccag ccacctt gcc ggac t cggc gcaact gct ggcgcgcggc ggat gt t ct 2340
 gt gacacaca at cagcgcgg accgcgcgc ggeccagccc cgggcaccct cct cggacgc 2400
 t cggggcaca ggaggct t cg ct ggaggggc t gggccaagg agat t aaga gaaaacgact 2460
 tt ct gca gga ggaagagccc gct gccgaat ccct gggaaa aat t ct t t c cccat gcc 2520
 agccggact g ccct cgcct t cgggt gt gc ct gt cccag t agat ggaat ggggt gt gg 2580
 ggg t cccgtt ct agaaacgg gct t t gggg cgt t cagg t t t ccaagg t gggacccaa 2640
 gat cgggggg cccagcagcc cgcaccgt ac gacccggact ct cggct ct t cact gct cct 2700
 cct ggctt gc ct agt t ccc agggccggc acct cct gct gcgagaccg gct ct cagcc 2760
 ct gcct t gcc cct acct t cag cgt ct ct t cc acct gct ggc ct cccat t ccc t cct gc 2820
 cagt cct t cgt cct t gacccct gc at cct cct cc ct gact cgc gccccat cgg 2880
 acgct ct ccc gggaccggc caggaccat t t ccat agac t gcgact gg ggt t t cct c 2940
 cagcagt t ac tt gat gccc ct ccccccggac acagact ct c aat ct gccc t ggt aagaac 3000
 cgg t ct gag ct ggcgt ct g agt gct gcg ggt ggaat gggggct gc ccact ccact 3060
 cct cccat cc cct cccagcc t ct cct ccg gcaaggact g aacagaacca caaaaagt ct 3120
 acat t at t aat at gal gg t ct t gaaa aaggaaacaaa acaacacaaa agccaccag 3180
 gct gct gctt t g t gaaaaga cgg t gt gt ct gt ggt gaaaacccgg t gt acat aac 3240
 ccc t cccct cgcggccccc cggccggcc cct gt cgc cccgcctt gggggctt 3300
 cct gt agat a cggccgcgt t ct gt gct gt gagat cgc gct cgt ggg ggggaaagggg 3360
 gggacacagc t acacgcaca t t aaaggacca gcaact cct g ggggagggg gcat t t t t a 3420
 t gtt acaaa aaaaat t acg aaagaaaaga aat ct ct at g caaaaat gacg aacat ggt cc 3480
 t g t ggact cc t ct ggct gt t t gt t ggt ct t ct ct gt aat t ccgt gt t t cgc t t t 3540
 t cct cccct gc ccc t ct ct cc ct ct gcccct ct ct cct c t ccc t ct gt c 3600
 t ct gt ct ct c t cct ct ct g t cgc t ct t gt ct gt ct t c t cggcct ct 3660
 ct ccccaagac ct gggccggc cgcct t ct ct cgcaggct a gat ccgaggt ggcagct cca 3720
 gccccccggc t cgcctt c gggccgt gc cccgcgc cccggccggc gaaggccggg 3780
 cccggccgt t cccggccgt a g t gct ct t cgt t ggt ggc gat gcccct gcat gt ct cc 3840
 t caccctt gg at cgt gacga ct cggaaat aa cggaaacaaa gt caat aaag t gaaaat aaa 3900
 t aaaaat cct t gacaaaat c cggaaaggct t ggat cct c gcccagat ct ct ct cccct g 3960
 cggccctt t t at t t gaga aggaaaaga gaaaagagaa t cgt t t aagg gaacccggcg 4020
 cccagccagg ct ccgt t ggc cggaaacggg cggcggggc ggcgaggccg ccgaggct ccg 4080
 gccccat cccca gt cct gt ggg gct ggccggg cagagacccc ggacccaggc ccaggcct aa 4140
 cct gct aat gt cccggac ggt t ct ggt c t cct cggca ct t t cgt g t cgg t t cgt 4200
 t t t gat t ct t t t ct t t gt gacat aaga aat aat aat aat aat aaaaat aaaaat 4260
 at t t t gt at g t caaaaaaaaaaaaaaaa 4290

<210>42

<211> 408

<212>PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética

Met	Asp	Met	His	Cys	Lys	Ala	Asp	Pro	Phe	Ser	Ala	Met	His	Pro	Gly
1				5					10				15		

His	Gly	Gly	Val	Asn	Gln	Leu	Gly	Gly	Val	Phe	Val	Asn	Gly	Arg	Pro
20							25					30			
Leu	Pro	Asp	Val	Val	Arg	Gln	Arg	Ile	Val	Gl	Leu	Ala	His	Gln	Gly
35							40					45			
Val	Arg	Pro	Cys	Asp	Ile	Ser	Arg	Gln	Leu	Arg	Val	Ser	His	Gly	Oys
50							55				60				
Val	Ser	Lys	Ile	Leu	Gly	Arg	Tyr	Tyr	Gu	Thr	Gy	Ser	Ile	Lys	Pro
65							70			75					80
Gly	Val	Ile	Gly	Gly	Ser	Lys	Pro	Lys	Val	Ala	Thr	Pro	Lys	Val	Val
85								90					95		
Asp	Lys	Ile	Ala	Gu	Tyr	Lys	Arg	Gln	Asn	Pro	Thr	Met	Phe	Ala	Trp
100								105					110		
Gu	Ile	Arg	Asp	Arg	Leu	Leu	Ala	Gu	Gly	Ile	Cys	Asp	Asn	Asp	Thr
115								120				125			
Val	Pro	Ser	Val	Ser	Ser	Ile	Asn	Arg	Ile	Ile	Arg	Thr	Lys	Val	Gln
130							135				140				
Gln	Pro	Phe	His	Pro	Thr	Pro	Asp	Gly	Ala	Gly	Thr	Gy	Val	Thr	Ala
145							150				155				160
Pro	Gly	His	Thr	Ile	Val	Pro	Ser	Thr	Ala	Ser	Pro	Pro	Val	Ser	Ser
								165				170			175
Ala	Ser	Asn	Asp	Pro	Val	Gly	Ser	Tyr	Ser	Ile	Asn	Gly	Ile	Leu	Gly
								180				185			190
Ile	Pro	Arg	Ser	Asn	Gly	Gu	Lys	Arg	Lys	Arg	Asp	Gu	Asp	Val	Ser
								195				200			205
Gu	Gly	Ser	Val	Pro	Asn	Gly	Asp	Ser	Gln	Ser	Gly	Val	Asp	Ser	Leu
								210				215			220
Arg	Lys	His	Leu	Arg	Ala	Asp	Thr	Phe	Thr	Gln	Gln	Gln	Leu	Gu	Ala
								225				230			240
Leu	Asp	Arg	Val	Phe	Gu	Arg	Pro	Ser	Tyr	Pro	Asp	Val	Phe	Gln	Ala
								245				250			255
Ser	Gu	His	Ile	Lys	Ser	Gu	Gln	Gly	Asn	Gu	Tyr	Ser	Leu	Pro	Ala
								260				265			270
Leu	Thr	Pro	Gly	Leu	Asp	Gu	Val	Lys	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Thr
								275				280			285
Asn	Pro	Gu	Leu	Gly	Ser	Asn	Val	Ser	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Pro	Val
								290				295			300
Val	Thr	Gly	Arg	Asp	Met	Ala	Ser	Thr	Thr	Leu	Pro	Gly	Tyr	Pro	Pro
								305				310			320
His	Val	Pro	Pro	Thr	Gly	Gln	Gly	Ser	Tyr	Pro	Thr	Ser	Thr	Leu	Ala
								325				330			335
Gly	Met	Val	Pro	Gly	Ser	Gu	Phe	Ser	Gly	Asn	Pro	Tyr	Ser	His	Pro
								340				345			350
Gln	Tyr	Thr	Ala	Tyr	Asn	Gu	Ala	Trp	Arg	Phe	Ser	Asn	Pro	Ala	Leu
								355				360			365
Leu	Met	Pro	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Leu	Pro	Leu	Leu	Pro	Leu	Pro	Met
								370				375			380
Thr	Ala	Thr	Ser	Tyr	Arg	Gly	Asp	His	Ile	Lys	Leu	Gln	Ala	Asp	Ser
								385				390			400
Phe	Gly	Leu	His	Ile	Val	Pro	Val								
								405							

5
<210>43
<211>4188
<212>ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
10
<400> 43

aggctccagt ctccggccga gtcttctcgc agccgcaacc caccggggc cagccccagag 60
ctgccagegc cgctcggtc cctccctccc tccccggccct tcggccgcgg cggcggtgcgc 120
ctgccttttc cggggggcggg ggccctggccc gcgcgtccc ctccccgcagg cgccaccccg 180
gacatccccg ggatgtcat ac ttctctgcca acttgccaa ctgcggcagca ctggagagg 240
cccggtccc ctccggcgc cctctgaccg ccccccggccc gcgcgtctc cgaccaccgc 300
ctctcgatg accaggttcc aggggagctg agcgagtgc cccccccccc cagcttgc 360
ctggctgca gctgcagcgc gagccatgcg ccccccagtgac accccggccc ggccaccgc 420

cccggggcca tt ct gct gac cgcccagccc cgagccccga cagt ggcaag tt gcggtt ac 480
 tgcagt t gca agt ccggcc aaccggagg agcccaagcg gggagcgcag tttt ggcgcc 540
 cccgcccccg cgcggcccgcc agcagccggg cgtt caactca tccctccctcc cccacccgtcc 600
 ctcccttttc tcccaagtc ct gaagt tga gttt gagagg cgacacccggc gggccggccg 660
 cgtt gct ccc get cct ct gc ct ccccat gg at at gcaat g caaaggagac ccctt ctccg 720
 cgat gcaacc agggcacccggg ggt gt gaacc agt cgggggg ggt tttt gt g aacggccggc 780
 cccctcccaacc cgtt ggt gagg cagccat cg tggat ggc ccacccagggt gt gggccct 840
 gt gacat ct c cggcagctg cgggt cagcc acggct gt gt cagcaaaatc ct gggcagg 900
 act acgagac cggcagcatc aagccgggtg t gat cggtggt ct ccaagccca aaagi ggcga 960
 cggccaaatg ggt ggacaag at t gct gaat acaaaccaca gaaccggact at gt t cgcct 1020
 gggagattcg agaccggctc ct ggccgagg gcat ct gt ga caat gacaca gt gcccagcg 1080
 tctcttccat caacagaatc at cccggacca aagt t cagca gctt tccac ccaacggccgg 1140
 at ggggctgg gacaggagtg accggccctg gccacaccat tttt cccaggc acggccctcc 1200
 ctcccttttc cagccctcc aat gaccat tggat cct a ctccat caat gggat cctgg 1260
 ggat t cct cg ct ccattt ggt gagaagagga aacgt gat ga agat gt gt ct gagggtt cag 1320
 tccccatgg agat t cccatg agt ggt gt gg acagt t tgcg gaagactt g cggact gaca 1380
 cccttaccctt gcaaggcagctg gaaaccttgg at cgggttctt tggat cctt tcccttccct 1440
 acgtt tcca ggcattcagat cacaat cagaacccaggc gaaaggat ac tcccttccct 1500
 cccttaccctt gggctt gat gaaat cagttt cggat tttt cccatccac aacccttggc 1560
 tgggcagccat cgtt gt caggcc acacccagat accggat tttt gactt ggt cgt gacat ggcga 1620
 gcaccactt ct gctt ggtt tttt ac cccctt caccg tggcccccac tggccagggtt agt accccca 1680
 ccttccaccctt ggcaggaaatg gt gctt gggg gcgagt tttt cccctt cccctt cccctt 1740
 cccatgttacac ggcctt acaac gaggctt ggtt gattt cagccaa cccggccctta ct aat ggcgc 1800
 ccccccgttcc gcccctt gccg ct gctt gcccgc tggctt at gac cggccactt agt taccgggggg 1860
 accacatcaa gctt caggcc gacagctt cggccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 1920
 cccggaggggag ggaggaccga cgcgacccggc tggccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 1980
 catccacca gcccccccaac ctccatcacatc accccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 2040
 gagccgtt ggg cgggaccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 2100
 ccccgccctgc ct ggaactt gggccggctt ggggggtt tttt gggccctt cccctt cccctt 2160
 ccaccaaggcc agcccccgggatggccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 2220
 cgcgcggccgg atgtt tctgtt gacacacaaat tttt cccctt cccctt cccctt cccctt 2280
 ggcacccggcc tggacgtt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 2340
 at t aagaaga aaacgactt tttt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 2400
 ttccttttccctt ccagt gccag cggactt gccc tccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 2460
 gat ggaatgg ggggtt gggg gttt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 2520
 ccaagggttgg gacccaaaggatggccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 2580
 cggcttcttca ct gctt ccttcc tggctt gctt agt tttt cccctt cccctt cccctt 2640
 gagacccggcc tccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 2700
 cccatgttccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 2760
 gacgttccgtt cccat cggac gctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 2820
 cggacttgggg tttt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 2880
 tcttccgggtt gttt aaaaacccggccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 2940
 ggggcttccctt acttccactt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 3000
 cagaaccacaaaatgtt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 3060
 aacacaaaatggccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 3120
 aaacccgggttccat tttt aaaaatggccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 3180
 tttt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 3240
 tcgttccgggtt ggtt aaaaatggccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 3300
 ggagggggggccat tttt aaaaatggccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 3360
 aaatgacggatgtt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 3420
 tttt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 3480
 ct tttt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 3540
 gctt tttt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 3600
 tccgggttgg cagcttccat cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 3660
 gggccggccggat gggccggccggat gggccggccggat gggccggccggat gggccggccggat 3720
 tggcccttgc atgtt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 3780
 caat aaatgtt aaaaatgtt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 3840
 ccagatctctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 3900
 gttt aagggtt aaaaatgtt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 3960
 cgaggccggcc gaggccggcc cccat cccat cccat cccat cccat cccat cccat cccat 4020
 acccaggccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 4080
 tt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt cccctt 4140
 taat aaataa agaataaaat tttt gttt atgtt cccctt cccctt cccctt cccctt 4188

<210>44

<211> 431

<212>PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética

5

<400> 44

Met	Asp	Met	His	Cys	Lys	Ala	Asp	Pro	Phe	Ser	Ala	Met	His	Pro	Gly
1			5					10				15			
His	Gly	Gly	Val	Asn	Gln	Leu	Gly	Gly	Val	Phe	Val	Asn	Gly	Arg	Pro
	20						25					30			
Leu	Pro	Asp	Val	Val	Arg	Gln	Arg	Ile	Val	Glu	Leu	Ala	His	Gln	Gly
	35				40			45				45			
Val	Arg	Pro	Oys	Asp	Ile	Ser	Arg	Gln	Leu	Arg	Val	Ser	His	Gly	Oys
	50				55			60							
Val	Ser	Lys	Ile	Leu	Gly	Arg	Tyr	Tyr	Glu	Thr	Gly	Ser	Ile	Lys	Pro
	65				70			75				80			
Gly	Val	Ile	Gly	Gly	Ser	Lys	Pro	Lys	Val	Ala	Thr	Pro	Lys	Val	Val
	85					90						95			
Asp	Lys	Ile	Ala	Gu	Tyr	Lys	Arg	Gln	Asn	Pro	Thr	Met	Phe	Ala	Trp
	100					105						110			
Glu	Ile	Arg	Asp	Arg	Leu	Leu	Ala	Gu	Gly	Ile	Oys	Asp	Asn	Asp	Thr
	115					120					125				
Val	Pro	Ser	Val	Ser	Ser	Ile	Asn	Arg	Ile	Ile	Arg	Thr	Lys	Val	Gln
	130					135				140					
Gln	Pro	Phe	His	Pro	Thr	Pro	Asp	Gly	Ala	Gly	Thr	Gly	Val	Thr	Ala
	145				150				155				160		
Pro	Gly	His	Thr	Ile	Val	Pro	Ser	Thr	Ala	Ser	Pro	Pro	Val	Ser	Ser
								165		170			175		
Ala	Ser	Asn	Asp	Pro	Val	Gly	Ser	Tyr	Ser	Ile	Asn	Gly	Ile	Leu	Gly
	180					185					190				
Ile	Pro	Arg	Ser	Asn	Gly	Gu	Lys	Arg	Lys	Arg	Asp	Glu	Val	Glu	Val
	195					200					205				
Tyr	Thr	Asp	Pro	Ala	His	Ile	Arg	Gly	Gly	Gly	Leu	His	Leu	Val	
	210					215					220				
Trp	Thr	Leu	Arg	Asp	Val	Ser	Gl	Gu	Gly	Ser	Val	Pro	Asn	Gly	Asp
	225					230					235			240	
Gln	Ser	Gly	Val	Asp	Ser	Leu	Arg	Lys	His	Leu	Arg	Ala	Asp	Thr	Phe
						245				250			255		
Thr	Gln	Gln	Gln	Leu	Gl	Ala	Leu	Asp	Arg	Val	Phe	Gl	Arg	Pro	Ser
	260					265					270				
Tyr	Pro	Asp	Val	Phe	Gln	Ala	Ser	Gl	His	Ile	Lys	Ser	Gl	Gln	Gly
	275					280					285				
Asn	Gl	Tyr	Ser	Leu	Pro	Ala	Leu	Thr	Pro	Gly	Leu	Asp	Gl	U	Val
	290					295					300				
Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Thr	Asn	Pro	Gl	Leu	Gly	Ser	Asn	Val	Ser
	305					310				315				320	
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Pro	Val	Val	Thr	Gly	Arg	Asp	Met	Ala	Ser	Thr
						325				330			335		
Thr	Leu	Pro	Gly	Tyr	Pro	Pro	His	Val	Pro	Pro	Thr	Gly	Gln	Gly	Ser
						340			345			350			
Tyr	Pro	Thr	Ser	Thr	Leu	Ala	Gly	Met	Val	Pro	Gly	Ser	Gl	Phe	Ser
						355			360			365			
Gly	Asn	Pro	Tyr	Ser	His	Pro	Gln	Tyr	Thr	Ala	Tyr	Asn	Gl	Ala	Trp
	370					375					380				
Arg	Phe	Ser	Asn	Pro	Ala	Leu	Leu	Met	Pro	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Leu
	385					390					395				400
Pro	Leu	Leu	Pro	Leu	Pro	Met	Thr	Ala	Thr	Ser	Tyr	Arg	Gly	Asp	His
						405				410				415	
Ile	Lys	Leu	Gln	Ala	Asp	Ser	Phe	Gly	Leu	His	Ile	Val	Pro	Val	
	420						425						430		

<210>45

<211>4257

<212>ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 390 083 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética

<400> 45

aggctccagg	c t cccggccga	gt c t t ct cgc	agccgcacc	cacccggggc	cagccccagag
ct gccagcgc	cgct cggct c	cc t ccctccc	t cccggccct	t cggccgccc	cggcgt gcgc
ct gccttttc	cggggggcggg	ggcttggccc	g cgcgcctcc	ct cccgcagg	cgccacactcg
gacatcccc	ggattgtctac	t t ct ct gcca	a ct t cgccaa	ct cggcagca	ct t ggagagg
cccggttccc	ct cccggcgc	cct ct gaccg	ccccggcccc	g cgcgccttc	cgaccaccgc
ct ct cggatg	accagg t tcc	aggggagctg	agcagtg cgc	ct ccccgccc	300
cct ggct gca	gt c gaggcgc	gagccat gcg	ccccca gtc	ct ccccttcc	cagctt cage
cccgggggca	t t ct gct gac	cgcccagccc	cgagccccga	accggcttcc	360
t gca gtt gca	agct cccggcc	a acccgagg	agccccagcg	g cggctt ac	420
cccgcccccg	cgcgccccgc	agcagccgg	cgt t ca ct ca	caggctt ccc	cagctt cage
ct cccctttc	t cctt caagt c	ct ga gtt t g	gt t gagagg	ccacccgttcc	360
cgcgtctccc	gt c ct ct g	ct ccccat gg	at at gca ct g	gcccacccgc	420
cgat gacccc	aggc acggc	ggi gt ga acc	agct cggggg	caggctt ccc	caggctt ccc
ccct acccga	c g i ggt gagg	cagcgc t cg	t ggagct ggc	ccacccgttcc	480
gt gacat ct c	ccggcagctg	cgggti cagcc	acggct gt gt	g gggctt ac	540
act acgagac	cggcagcatc	a agccgggt g	t gat cgg t gg	t t ccccttcc	600
cgc ccaa agt	ggi ggacaag	at t gct gaa t	aca aacgaca	ccacccgttcc	660
gggagat t cg	agacccgctc	ct ggccgagg	gcat ct gt ga	g cggccggcc	720
t ct ct tccat	caacagaatc	at cccgacca	a a g t t cagca	ccacccgttcc	780
at ggggct gg	gacaggagt g	accggccctg	g ccacacccat	g t gggctt ac	840
ct cct gt t c	cagcgcctcc	a a t gaccag	t gggat cct a	c a a a a a t c	900
ggat t cct cg	ct ccaat ggt	gagaagagga	a a c g t g a t g a	ct ccaat caat	960
ct gcccacat	t agaggaggt	ggagggttgc	at ct ggt ct g	gggat cct gg	1020
aggcgt cagt	cccaat gga	gat t cccaga	g t ggt gt gga	t a c a c t g a t c	1080
gagct gacac	c t t caccagg	cagcaget gg	a a g t t t g g a	g a t g t g t c t g	1140
ctt accct ga	c g i t t c c a g	g o a t c a g a g	g a c i t t a a g a	acggctt ccc	1200
ccct cccagg	cct gacccct	gggct t gat g	t t cccat caat	gggat cct gg	1260
accct gagct	ggcagcaac	g t g t c a g g a	g a t g t g a t c	g a t g t g t c t g	1320
acat ggccag	c a c c a c t c t g	cct ggt t acc	g a c i t t a a g a	aa g c a c t t g c	1380
get accccac	c t c c a c c t g	g c a g g a a t g g	t t cccat caat	g a g c g t t c t t	1440
acagccaccc	cc a g t a c a c g	g c c t a c a a c g	g a t g t g a t c	g a g c g t t c t t	1500
t a a t g c c c	ccccgttccg	ccccct g c c g	t g c t g c c g	aa a c a g g t t	1560
accg cgggga	cc a c a t a a g	ct t c a g g c g	g c c a t c c a c	g a c a g t i a c t	1620
g a c c c a c c	c g g a g g g a g g	g a c a g t t c g g	g c c a t c c a c	g a c a g t i a c t	1680
g c c t c a c c	at cccat gac	g c c t t c c a c	g c c a t c c a c	g g c c a g g g a a	1740
g g a c g g g t t g g	g a g c g t t g g c	g c c t t c c a c	g c c a t c c a c	g g c a a c c g t	1800
g c c c c c c t c	c c c c c t g c c	g c c t t c c a c	g c c a t c c a c	g c c a c c c t t a c	1860
t c c c g c t c	c c a c a a g c a	g c c t t c c a c	g c c a t c c a c	g c c a c c c t t a c	1920
accc t g c t c	t t a a g a a g a a	g c c t t c c a c	g c c a t c c a c	g c c a c c c t t a c	1980
t g g g a a a a t	t c t t t t c c c	g c c t t c c a c	g c c a t c c a c	g a c c g g c c c a	2040
g i c c c a g a g	at g g a t g g g	g c c t t c c a c	g c c a t c c a c	g a g g g g g g g a	2100
c a g g t t t t c	caagg t t g g g	g c c t t c c a c	g c c a t c c a c	g a g g g g g g g a	2160
c e g g a c t t c	g g c t t c t c a c	g c c t t c c a c	g c c a t c c a c	g c c c a g t t c g	2220
t c c t g t g c g	ag a c c c g g t	t g g a c t g g c	g g g g g a t t c g	g c c c a g t t c g	2280
t g c t g g c t c	c c a g i t t c c	g g c c c g c g t	g c c c a g t t c g	g c c c a g t t c g	2340
c t c t c c t g	act cgcagcc	g c c c c a g g c a	g c c c a g t t c g	g c a g c g c g g	2400
c a t a g a c g c	g g a c t g g g t	t g t t t c t g t g	g g c t t c g t g	g a g g g g t t g g	2460
g a c t c t a a t	c t g c c g t t g g	a a c g a c t t c	t g c a g g a g g a	g a g g c c c g t	2520
t g g a a g t g g	g g g c t g c c c a	t g c a g g a g g a	t t c c c t t c c g	g g l g l g c c c t	2580
g g a a c t g a a c	g a g a c c a c a a	g g t g l g g g g	t t c c c g g g t	t t g g g g g c g t	2640
g a a c a a a a c a	a c a c a a a a g c	a c c c a a g g a t	g c c a c c c t t c	a c c g a t c g a g	2700
g t g a a g g c g a	a a c c c g g t g t	t g c t t c c t c t	g c c a c c c t t c	g c c c g c c c a c	2760
t a g a g t c c t	g t c g c c c t c	c t c t t c c c c t	g c c a c c c t t c	g c c c t g a t c	2820
g a g t c t c a a t	c t g c c g t t g g	c t c t t c c c c t	g c c a c c c t t c	g c c c g c g a g	2880
t g g a a g t g g	g g g c t t c c c t	c a g t t a c t t g	g a c c a c c c t t c	g a c c a g t t t c	2940
g g a a c t g a a c	g a a a c c a c a a	t t c t t c a g c t g	g a c c a c c c t t c	ccccacacaca	3000
g a a c a a a a a a g	a a a a a a a a a a g	t t a a t t a a l	t t c c c t t c c g	t t c c c t t c c g	3060
g t g a a g g c g a	a c a c a a a a a g c	cc a c c a g g c t	g a c c a c c c t t c	g a c c a c a g c a	3120
t g g a a g t g g	a a c c c g g t g t	g c t g c t t t g t	g a a a a g a a a a t	t g g t g t c g t	3180
g g c c c t g c t	g t a c c c c t c	a c a t a a c c c	g g a a a g a c g g	cc c g g c c c c g	3240
g t a g a t a a a t	g t a c c c c t c	t t c c c t c c g	ccccggcccc	g t g c t g t g a g	3300
t c c t c t c c g	t t c t t c c c c	g t a g a t a c g c	ccccgt t c t	a a g c a c a g c a	3360
t c t g t c t c g	c t c t t c c t c	g a a g g g g g g	ac a c a g c t a c	a a f t a c g a a a	3420
c a g g c t a a g t	c c g a g g t g g c	t t t t t t a g t	t a c a a a a a a a a	g a a a a g a a a a t	3480
g c g c c c c c g	g g c g c c c c g a a	t a c g g t t t t t	g g a c t c c t c t	g t t g g c t t c t	3540
t a g t g g c g a t	g g c g c c c c g a a	c g c t t t t t c c	t c c t t c c t c	t g c c c c t t c t	3600
a a a c a a a a a a t	a a t a a a g i g a	t c t c t g t c t c t	g t c t c t c t c c	g t c t c t g t c g	3660
g a t c t c g c c	c a g a t c t c	g g c c t t c t c	g c c a g a c c t g	c c t g t c t c c g	3720
t c c t c t c c g	t t c t t c c c c	a c t c c a g g c	ccccggccg	g g c g c t c c c c	3780
t t c t g t c t c g	c t c t t c c t c	g g c c t t c t c	ccccgt t a g t t	g c t t t t c c g	3840
c a g g c t a a g t	c c g a g g t g g c	a a a t a a a a a a	g t g a c g a c t c	g a a a t a a a c a g	3900
g g c g c c c c g a	g g c g c c c c g a a	a a a t a a a a a a	t t t g a g a a g g	a a a a g g c g a	3960
t a g t g g c g a t	t t t a a a a a a a a	a a a t a a a a a a	g c c t t t t t t a	a a a a a g a g a g a a	4020

cgagggcgcc gaggcgccg aggtccggcc catcccagt c ctgtgggcgt ggccgggcag 4080
 agaccccgga cccaggccca ggctaacct gctaaatgtc cccggacggt tctggctcc 4140
 tcggccactt tcagtgctc ggttcgtttt gattttttt cttttgtaca cat aagaat 4200
 aaataataat aataataaa gaataaaatt ttgtatgtca aaaaaaaaaaaaaaaa 4257

5 <210>46
 <211> 104
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética

15 <400> 46

ttcccccttg actgtggcac ctccctttag tccgtcgac gaggttgtgc aatccaccag 60
 tcttataat acagtgacgc tccagcctt ggaagccctt gtca 104

20 <210>47
 <211>17
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética

30 <400> 47
 tcaagcgtga ctataattg 17

35 <210>48
 <211> 20
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética

45 <400> 48
 actgccat t gccaaacac 20

50 <210>49
 <211>21
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética

<400> 49
 aaaatcttgcagcttccccc 21

<210>50
 <211> 23
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética

<400> 50
 gtcggttacggagcgaggag 23

<210> 51

<211> 24
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400> 51
 t aacat at ag acaaacgcac a.C. 24
 10 <210>52
 <211> 23
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400> 52
 gcgct t gt gt cgccat t gt a 11 c 23
 20 <210>53
 <211>24
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400> 53
 gt cacaccac agaagt aagg 11 cc 24
 30 <210>54
 <211> 23
 35 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 40 <400> 54
 gt cgtt acg gagcggaccg gag 23
 <210>55
 <211> 25
 45 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 50 <400> 55
 cacagagcat t ggcgt ct c gat gc 25
 <210>56
 <211> 20
 55 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 60 <400> 56
 acccgact at gt t cgcct gg 20
 <210>57
 <211>21

<212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400> 57
 aagct ct gga t cgagt ct 11 g 21
 10 <210>58
 <211> 20
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400> 58
 atgtgtcagg cacacagacg 20
 20 <210>59
 <211>21
 <212>ARN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400> 59
 30 gucgagucua ucugcaucc t 21
 <210>60
 <211>21
 <212>ARN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 40 <400> 60
 ggaugcagau agacucgact t 21
 <210> 61
 <211> 19
 45 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 50 <400> 61
 tcagcagtgg aggccaatg 19
 <210>62
 <211> 23
 55 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400> 62
 cct ct gt aac aggt gcct t g aat 23
 60
 65 <210>63

5 <211>21
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400> 63
 acagcaaacc t cct cacagc c 21
 15 <210>64
 <211> 20
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 <400> 64
 t ggagacgt g gcacct ct t g 20
 25 <210>65
 <211> 24
 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 30 <400> 65
 t at gat accc gggagat cgt gat c 24
 <210>66
 <211> 24
 35 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 40 <400> 66
 gt gcagat gc cggt t caggt act c 24
 <210>67
 <211> 20
 45 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 50 <400> 67
 t cagccct gg act acct gca 20
 <210>68
 <211> 20
 55 <212>ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
 60 <400> 68
 gaggt cccgg t acaccacgt 20

REIVINDICACIONES

1. Un kit para monitorizar afecciones de próstata en un sujeto, que comprende:
 - 5 un primer par de cebadores de PCR para detectar la expresión de DEFB1 en un tejido de dicho sujeto, teniendo preferentemente el primer par de cebadores de PCR las secuencias de nucleótidos de SEC ID Nº: 35 y 37;
 - 10 un segundo par de cebadores de PCR para detectar la expresión de PAX2 en el mismo tejido de dicho sujeto, seleccionándose preferentemente el segundo par de cebadores de PCR del grupo que consiste en SEC ID Nº: 43 y 47, SEC ID Nº: 44 y 48 y SEC ID Nº: 45 y 49; y
 - 15 un tercer par de cebadores de PCR para detectar la expresión de un primer gen de control en el mismo tejido de dicho sujeto, siendo preferentemente el primer gen de control el gen GAPDH o el gen β-actina y/o seleccionándose preferentemente el tercer par de cebadores de PCR del grupo que consiste en SEC ID Nº: 42 y 46 y SEC ID Nº: 34 y 36.
2. El kit de la reivindicación 1, que adicionalmente comprende un cuarto par de cebadores de PCR para detectar la expresión de un segundo gen de control en el mismo tejido de dicho sujeto, en el que el primer gen de control es preferentemente el gen β-actina y el segundo gen de control es preferentemente el gen GAPDH.
- 20 3. El kit de la reivindicación 1 ó 2, que adicionalmente comprende una ADN polimerasa, reactivos para la reacción PCR, una transcriptasa inversa y/o reactivos para la extracción del ARN.
4. Un método *ex vivo* para monitorizar afecciones de próstata en un sujeto, que comprende:
 - 25 determinar la proporción de la expresión del gen de caja emparejada 2 con respecto al gen beta defensina-1 (PAX2 con respecto a DEFB1) en células obtenidas de la próstata del sujeto, en el que la proporción de la expresión de PAX2 con respecto a DEFB1 se correlaciona con afecciones prostáticas.
 - 30 5. El método de la reivindicación 4, en el que la proporción de la expresión de PAX2 con respecto a DEFB1 de 100:1 o superior es indicativa de la presencia de cáncer de próstata en el sujeto, una proporción de expresión de PAX2 con respecto a DEFB1 de 40:1 o superior, pero inferior a 100:1, es indicativa de la presencia de neoplasia intraepitelial prostática (PIN) en el sujeto y una proporción de expresión de PAX2 con respecto a DEFB1 de menos de 40:1 es indicativa de próstata normal en el sujeto.
- 35 6. El método de las reivindicaciones 4 ó 5, en el que la etapa de determinación comprende:
 - determinar el nivel de expresión del gen PAX2 con respecto al nivel de expresión de un gen control, siendo preferentemente el gen control el gen GAPDH;
 - 40 determinar el nivel de expresión del gen DEFB1 con respecto al nivel de expresión del mismo gen de control, siendo preferentemente el gen de control el gen GAPDH, y
 - determinar la proporción de la expresión de PAX2 con respecto a DEFB1 basándose en los niveles de expresión de PAX2 y DEFB1, y los niveles de expresión de PAX2, DEFB1 y los genes control se determinan preferentemente mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real.

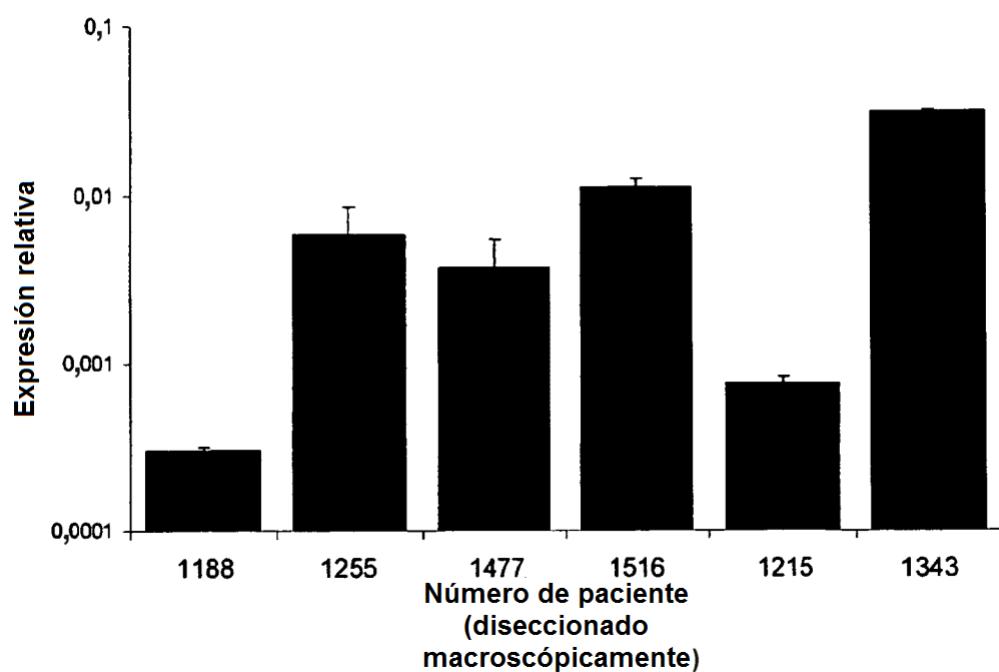


FIG 1A

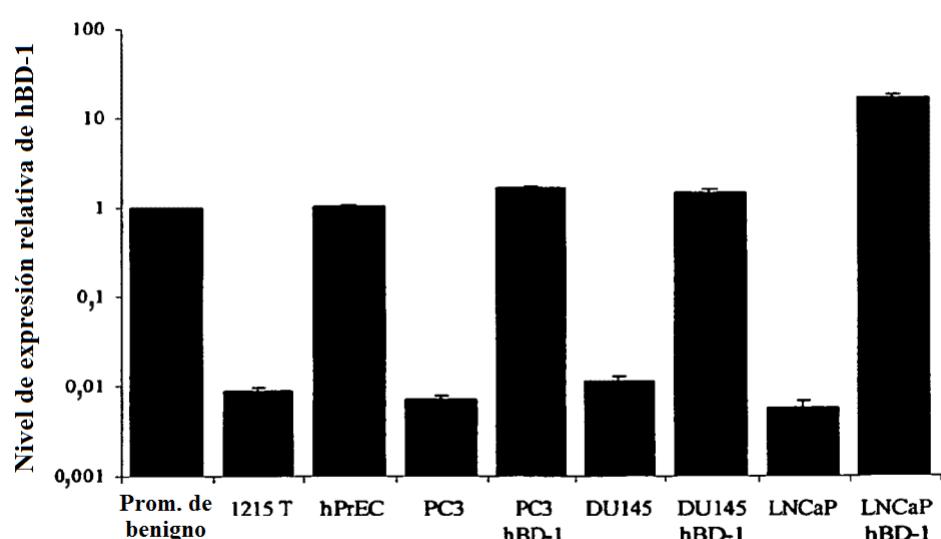


FIG 1B

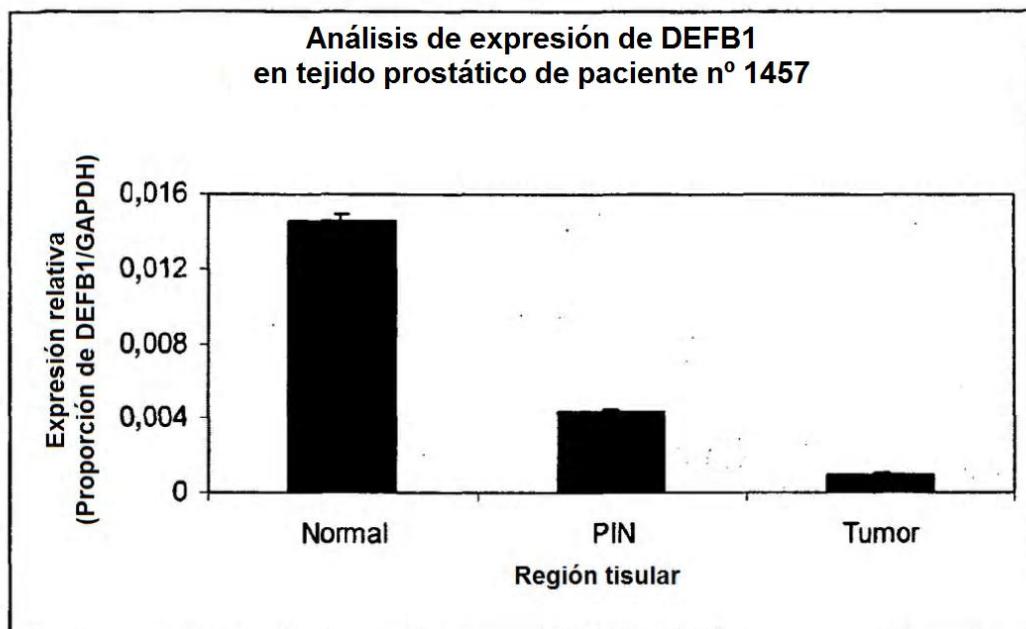


FIG 1C

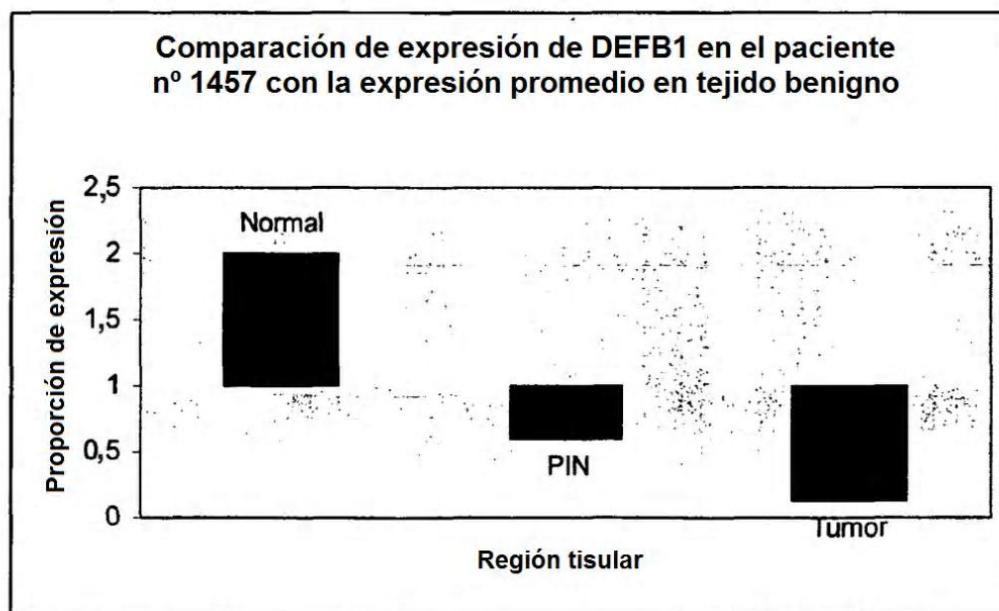
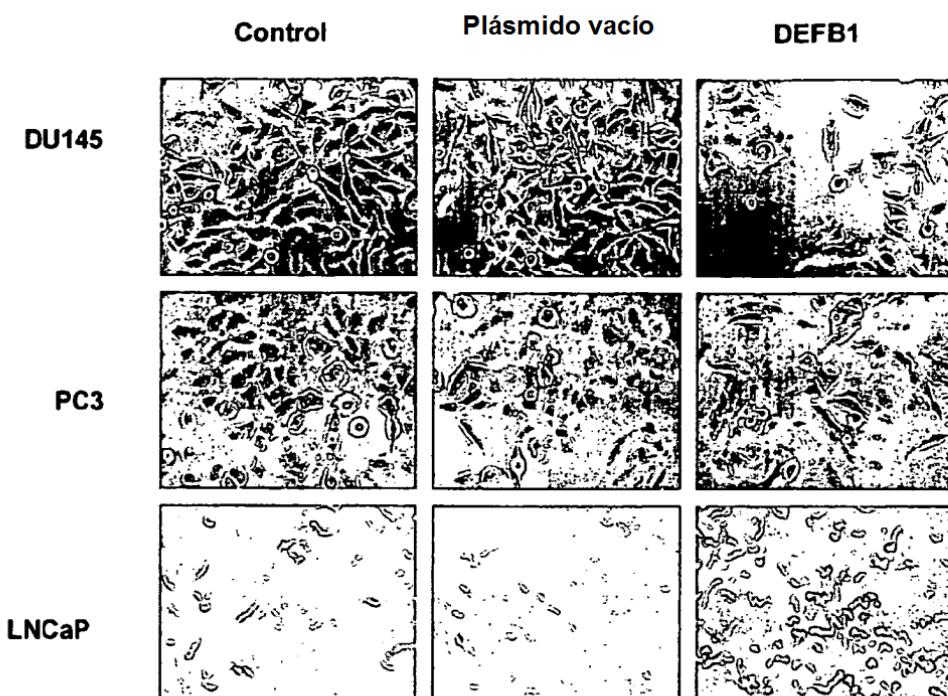
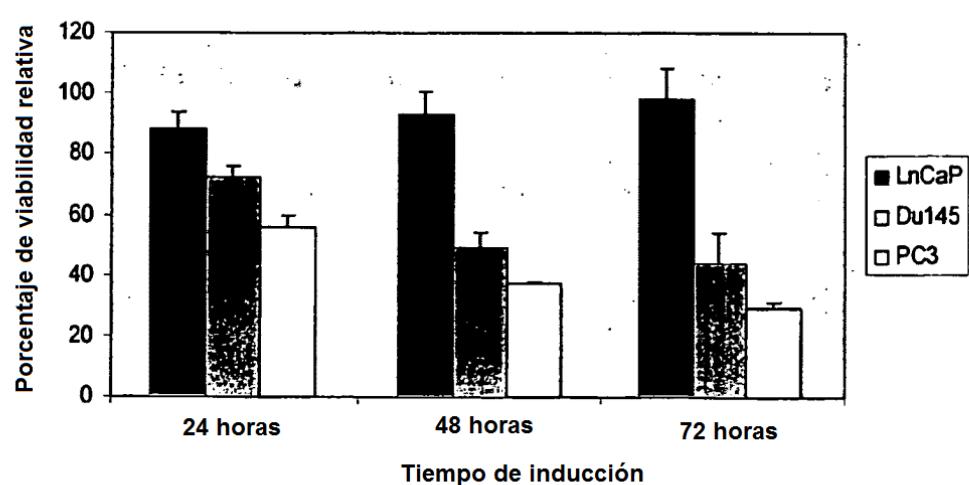


FIG 1D

**FIG 2****FIG 3**

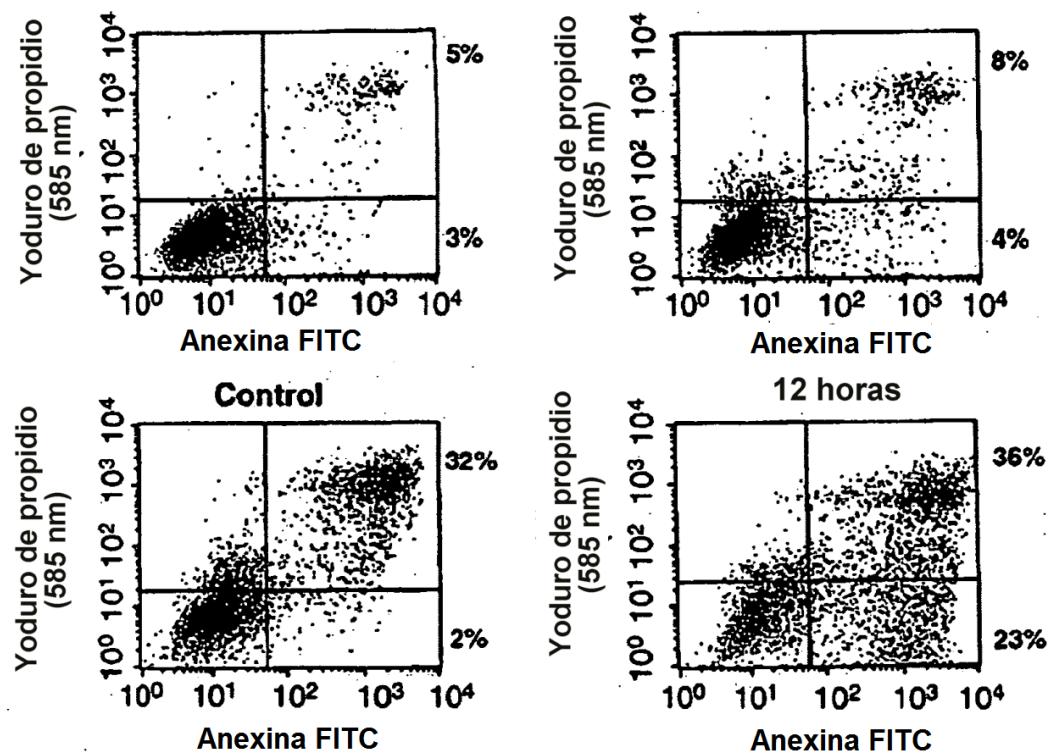
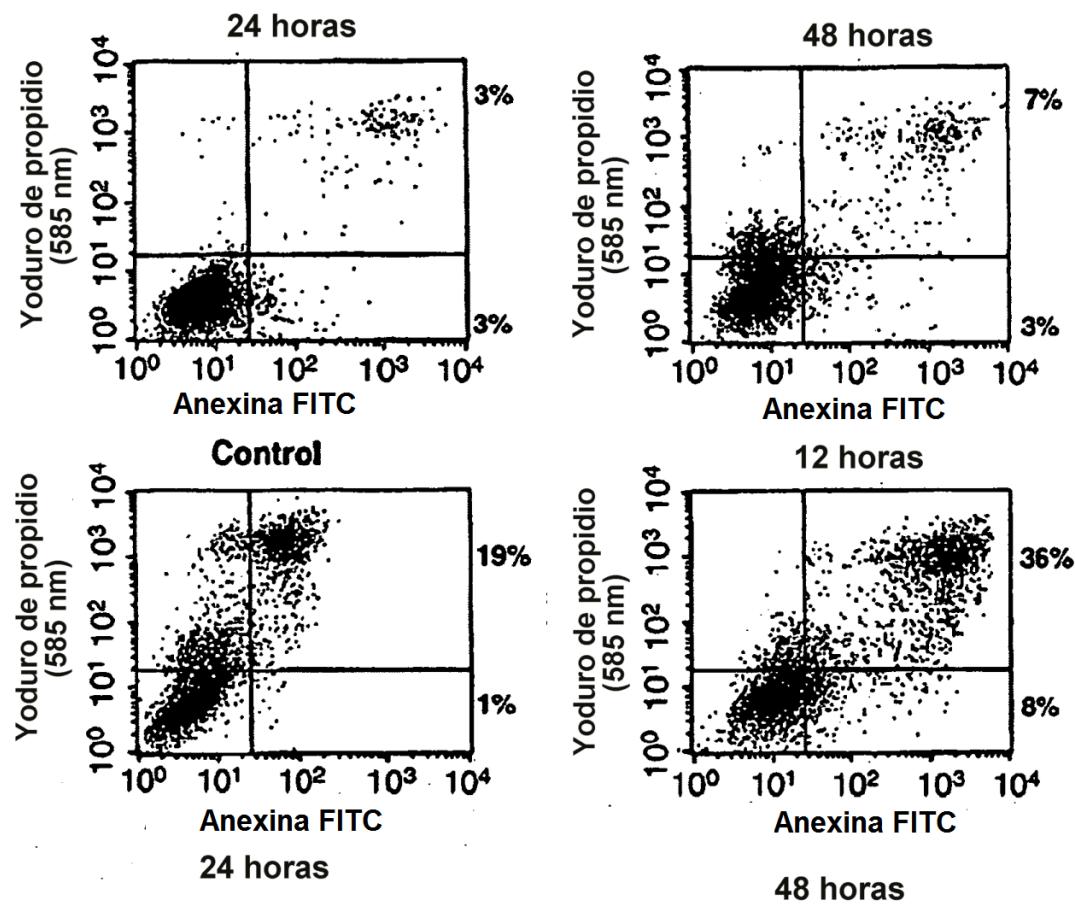


FIG 4A

**FIG 4B**

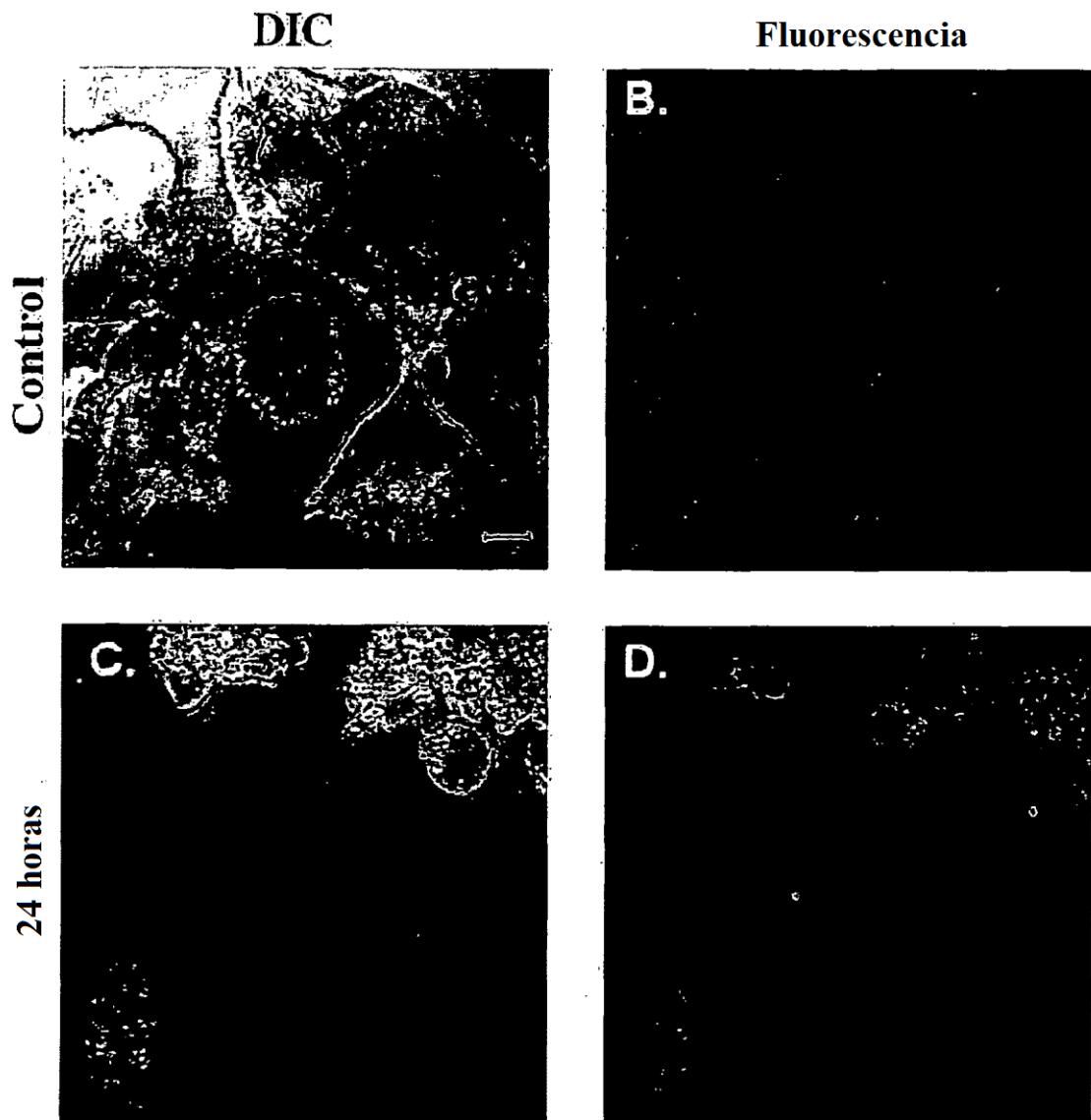


FIG 5A-D

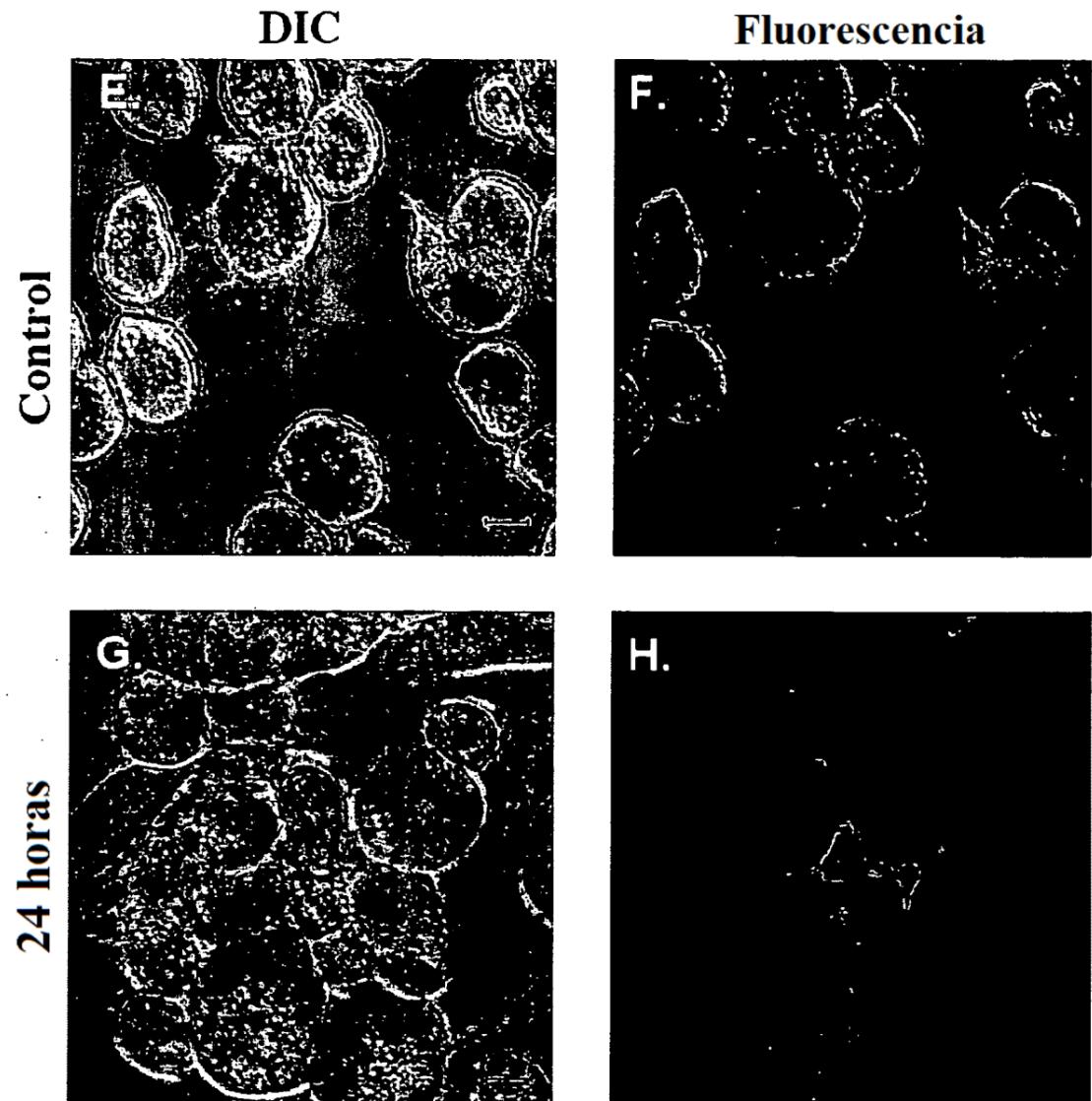


FIG 5E-H

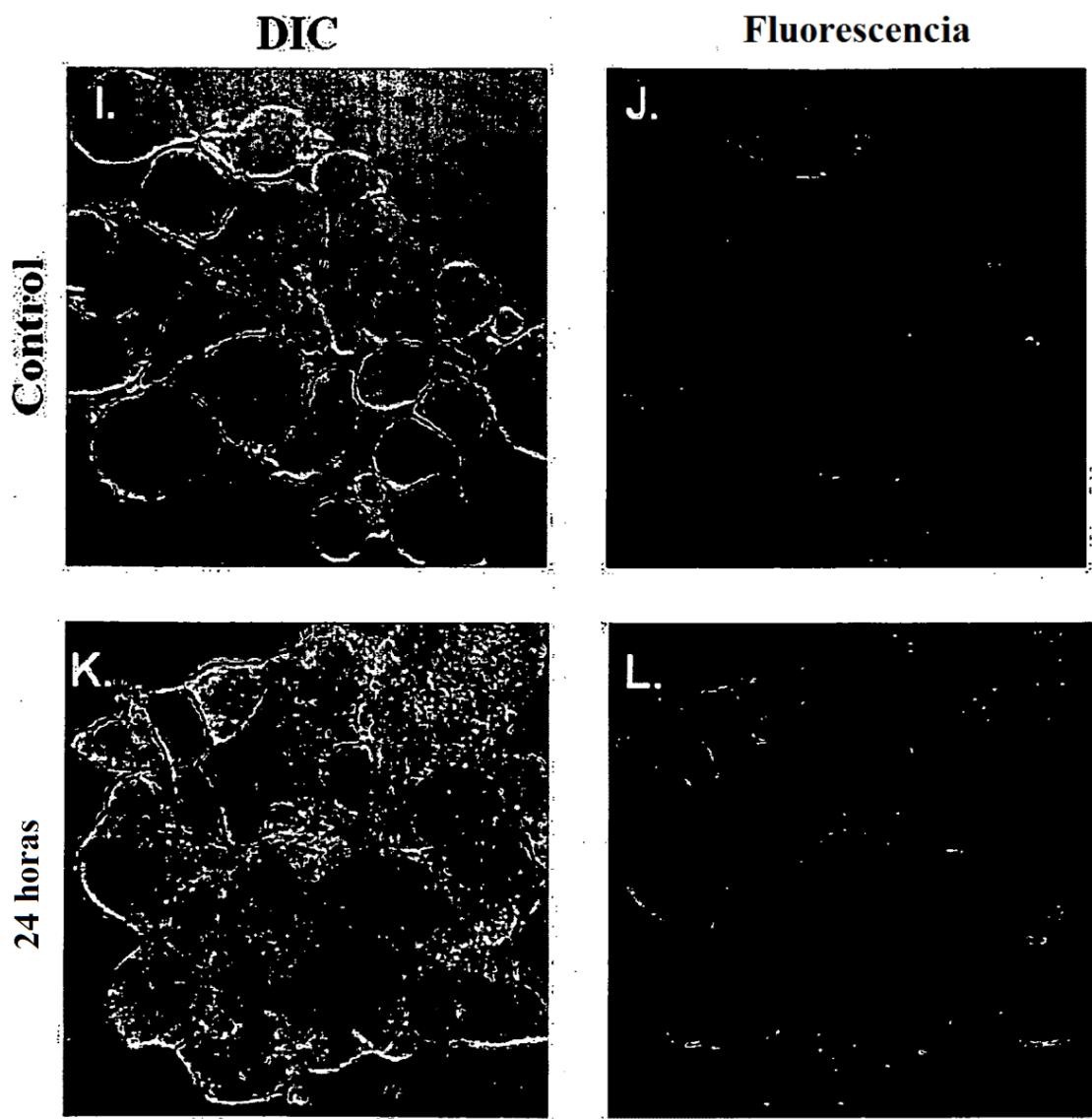


FIG 5I-L

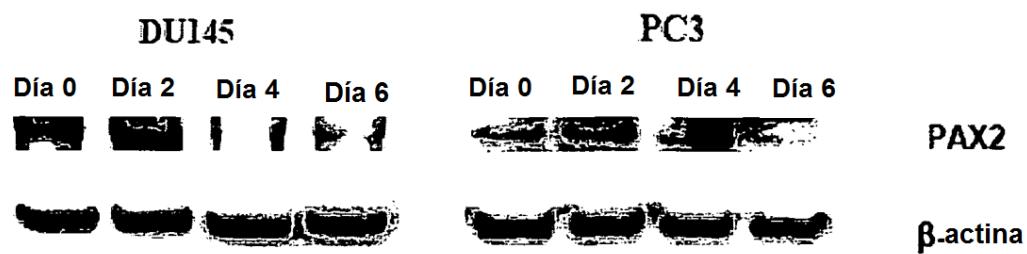


FIG 6

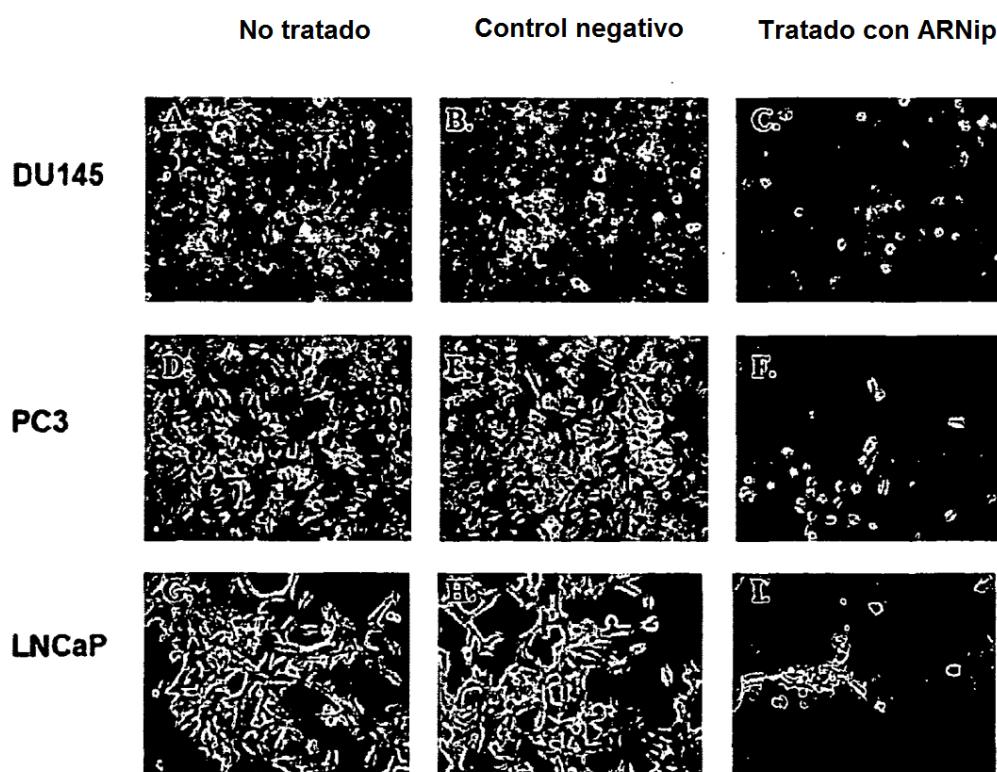
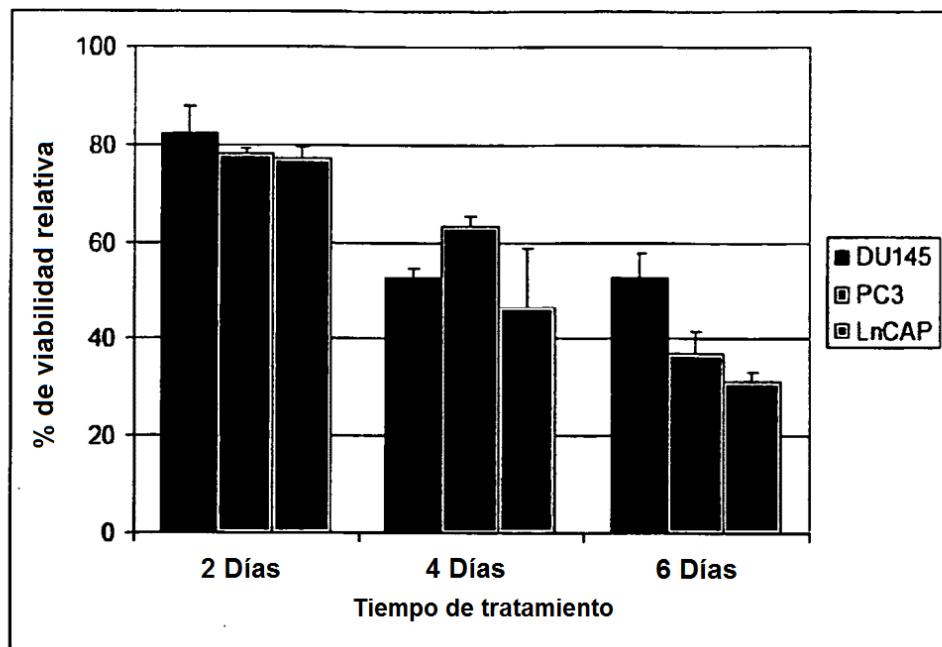
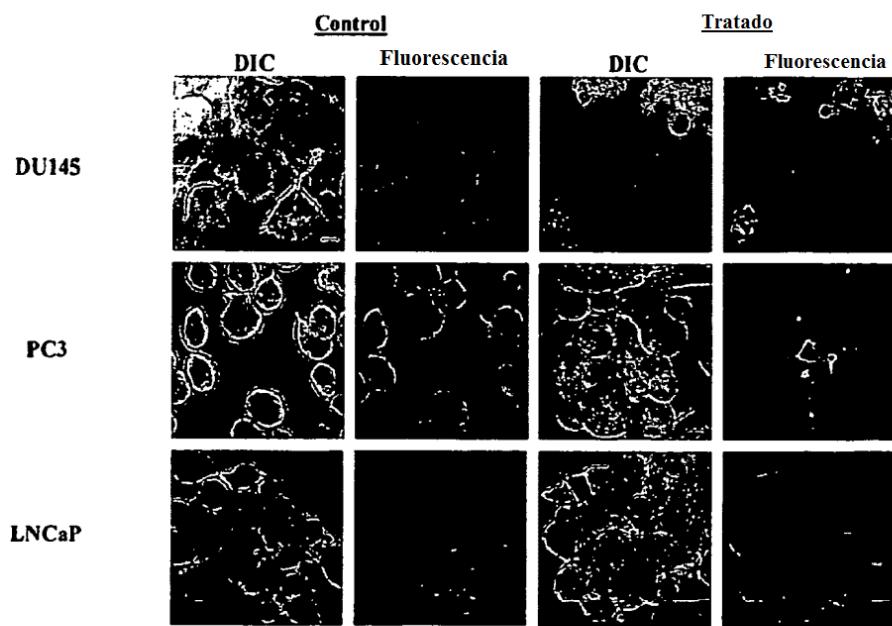


FIG 7

**FIG 8****FIG 9**

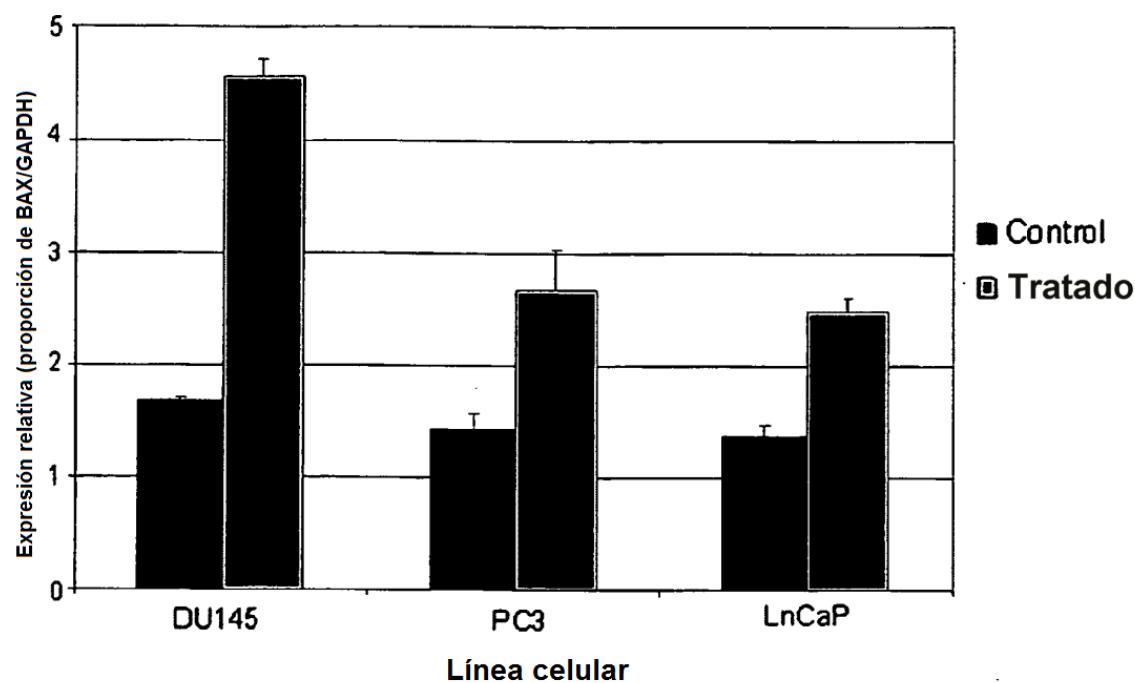


FIG 10A

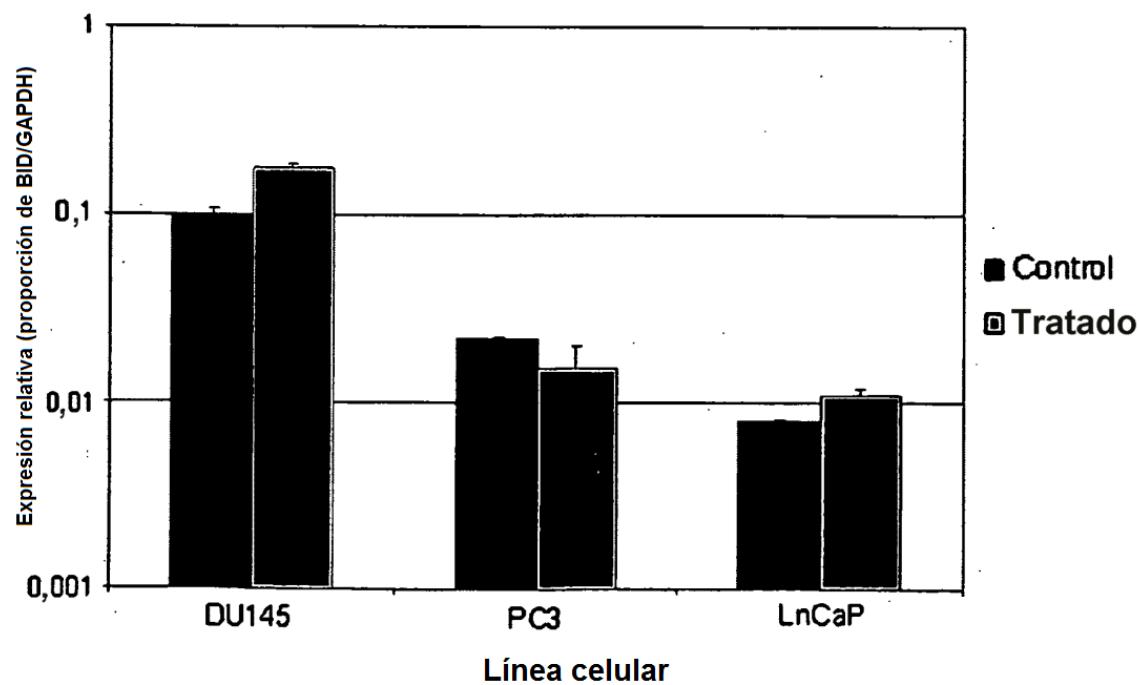


FIG 10B

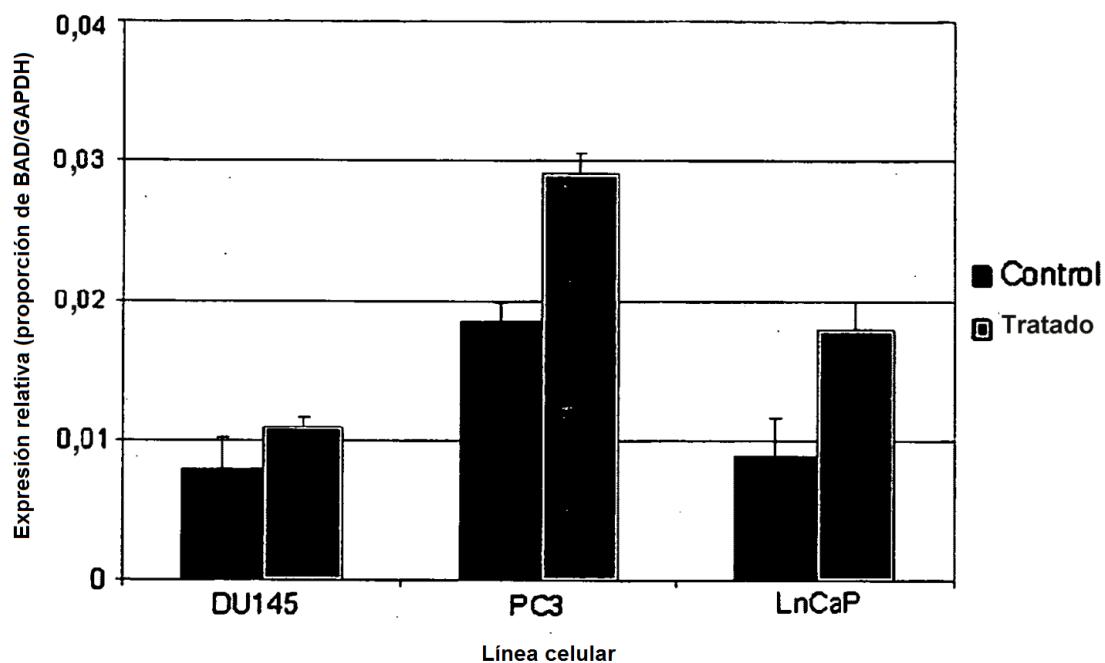


FIG 10C

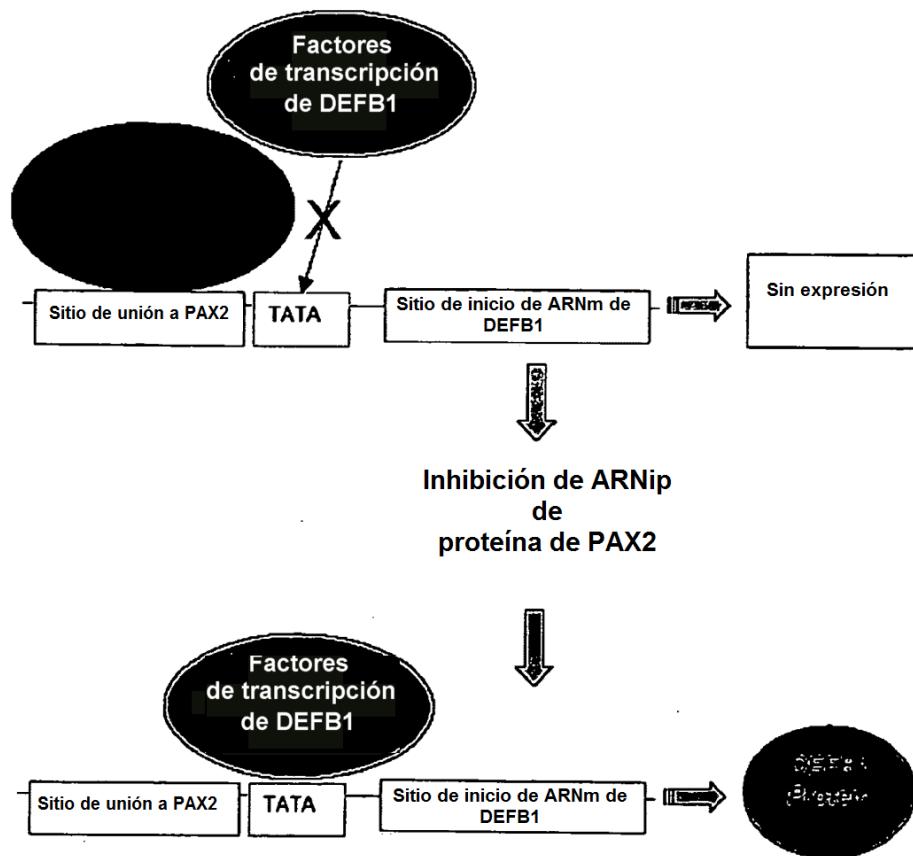


FIG 11

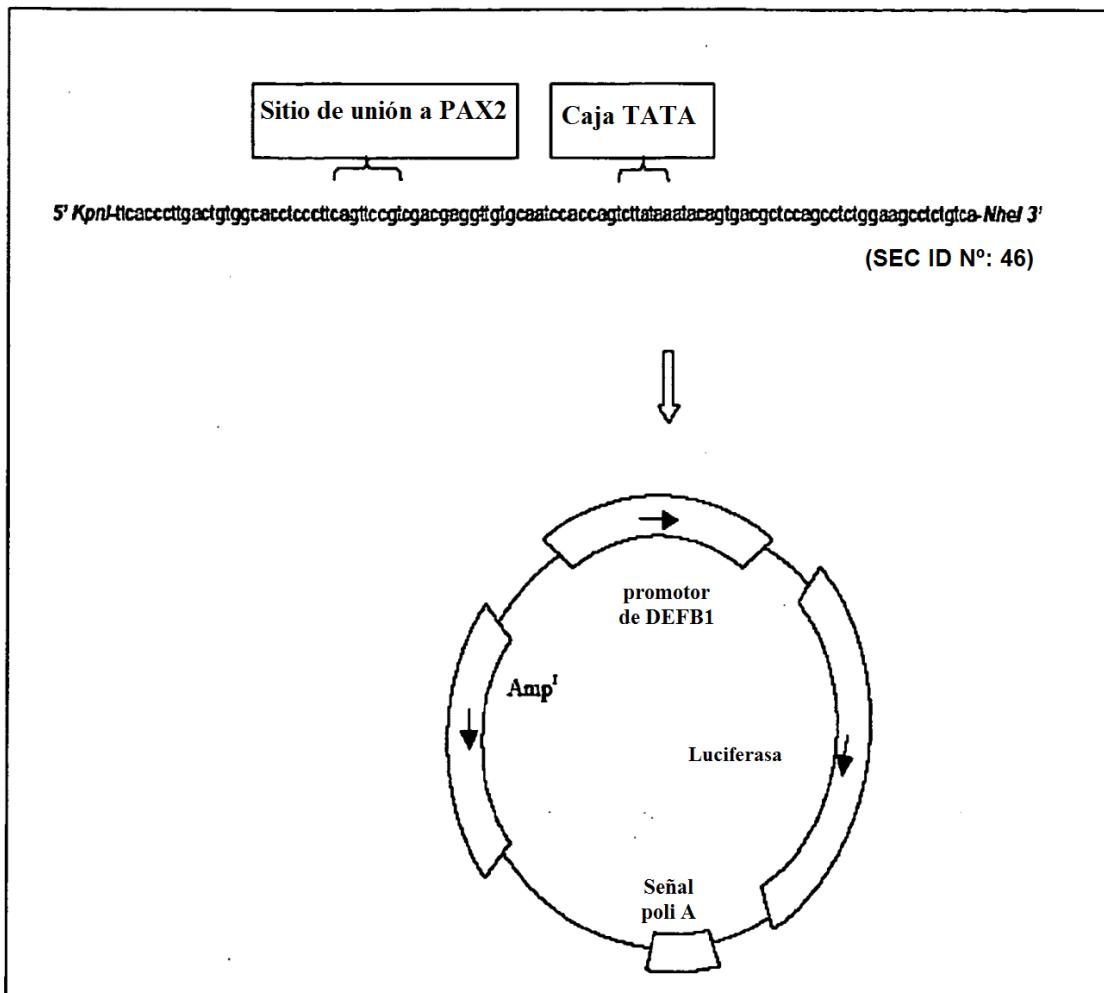


FIG 12

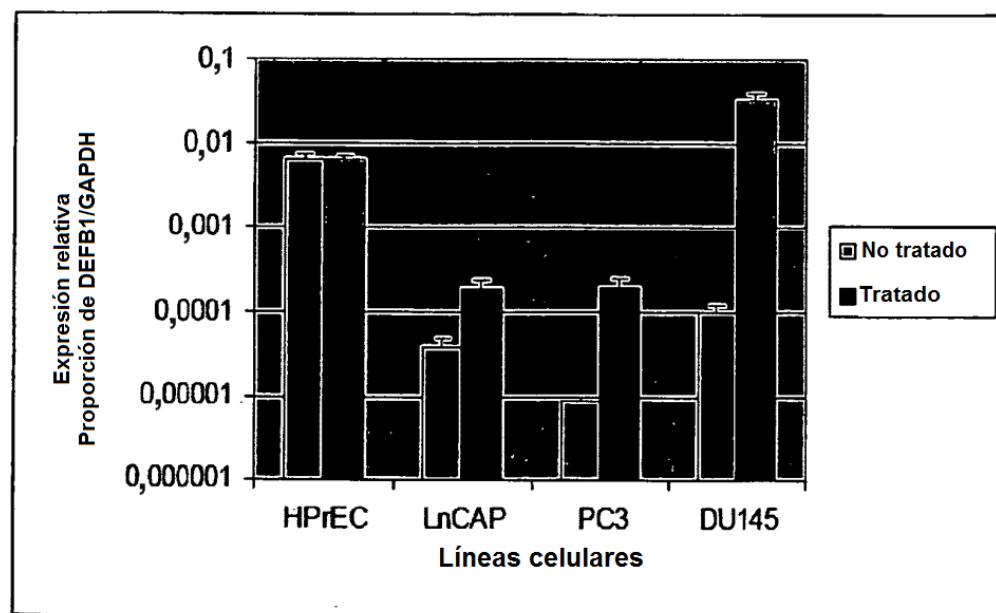


FIG 13

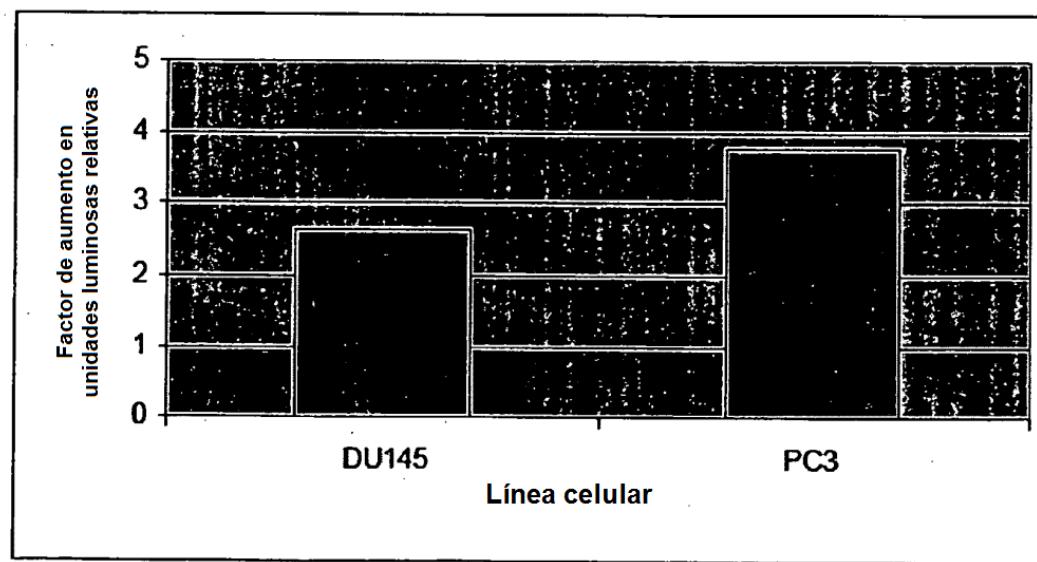


FIG 14

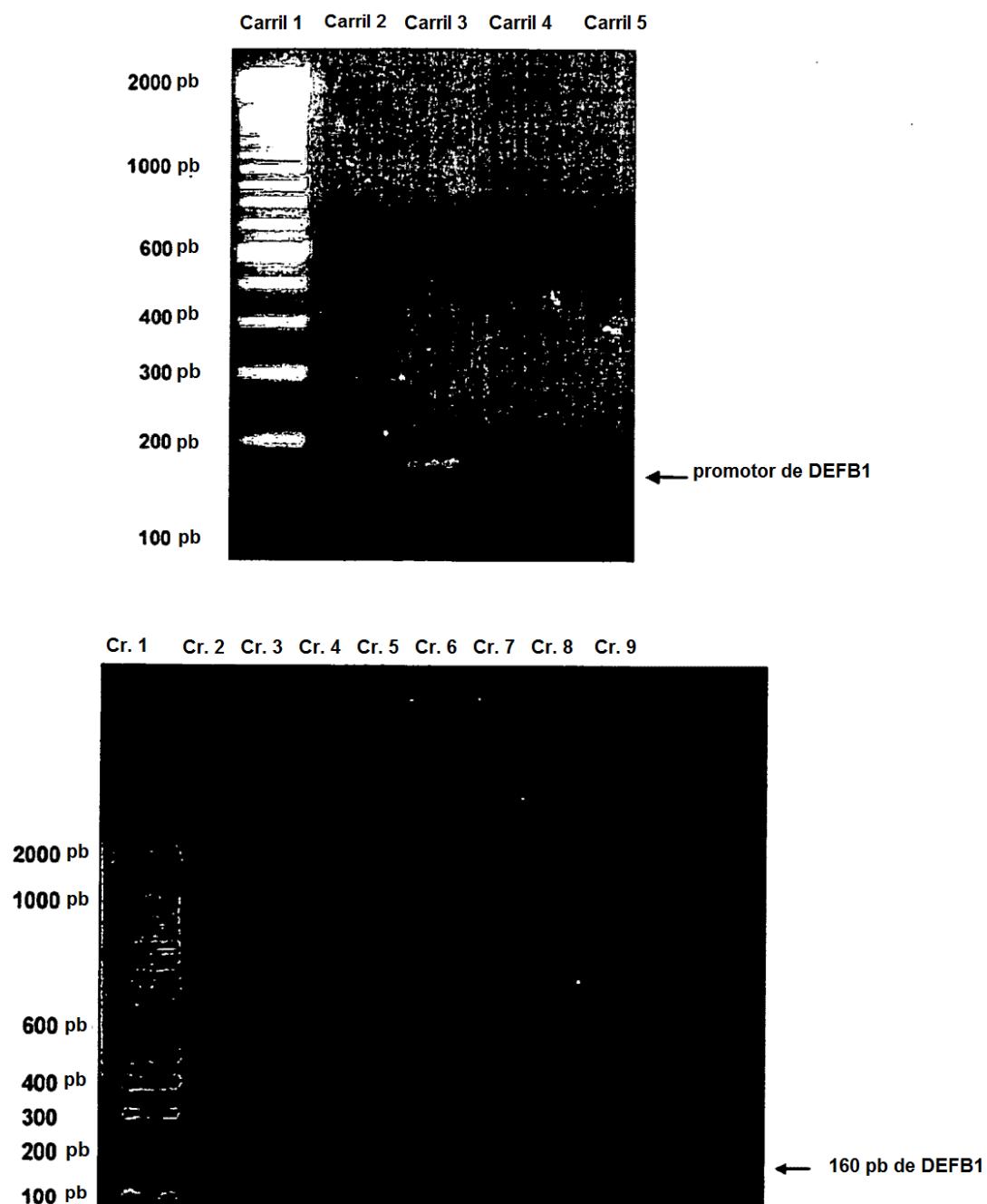


FIG 15

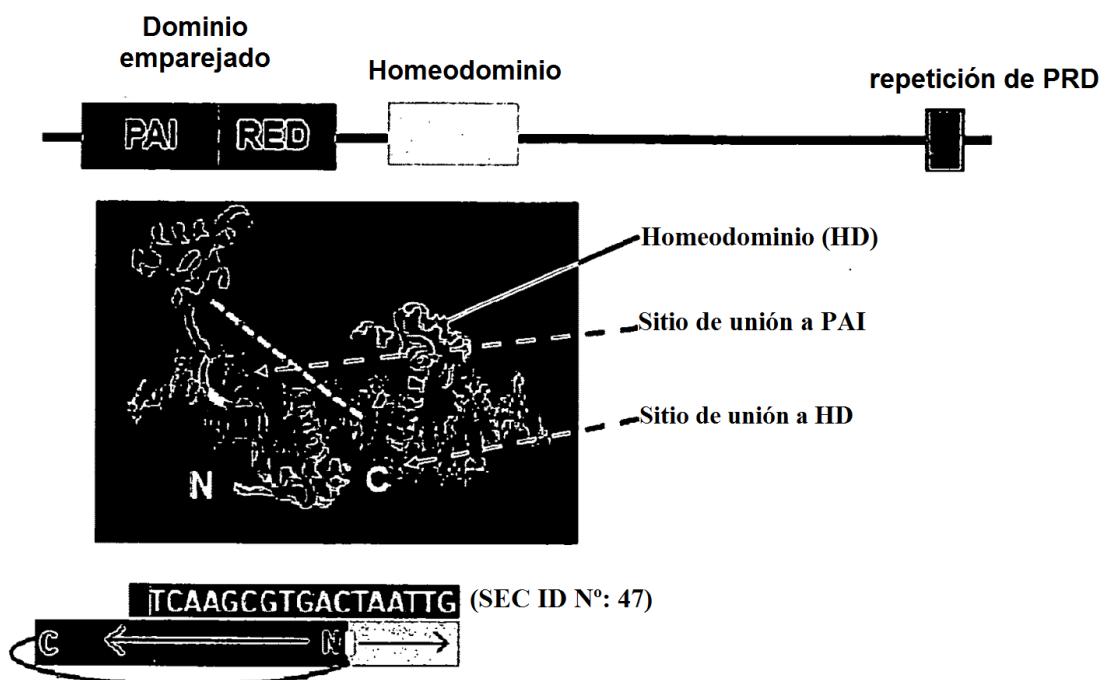


FIG 16

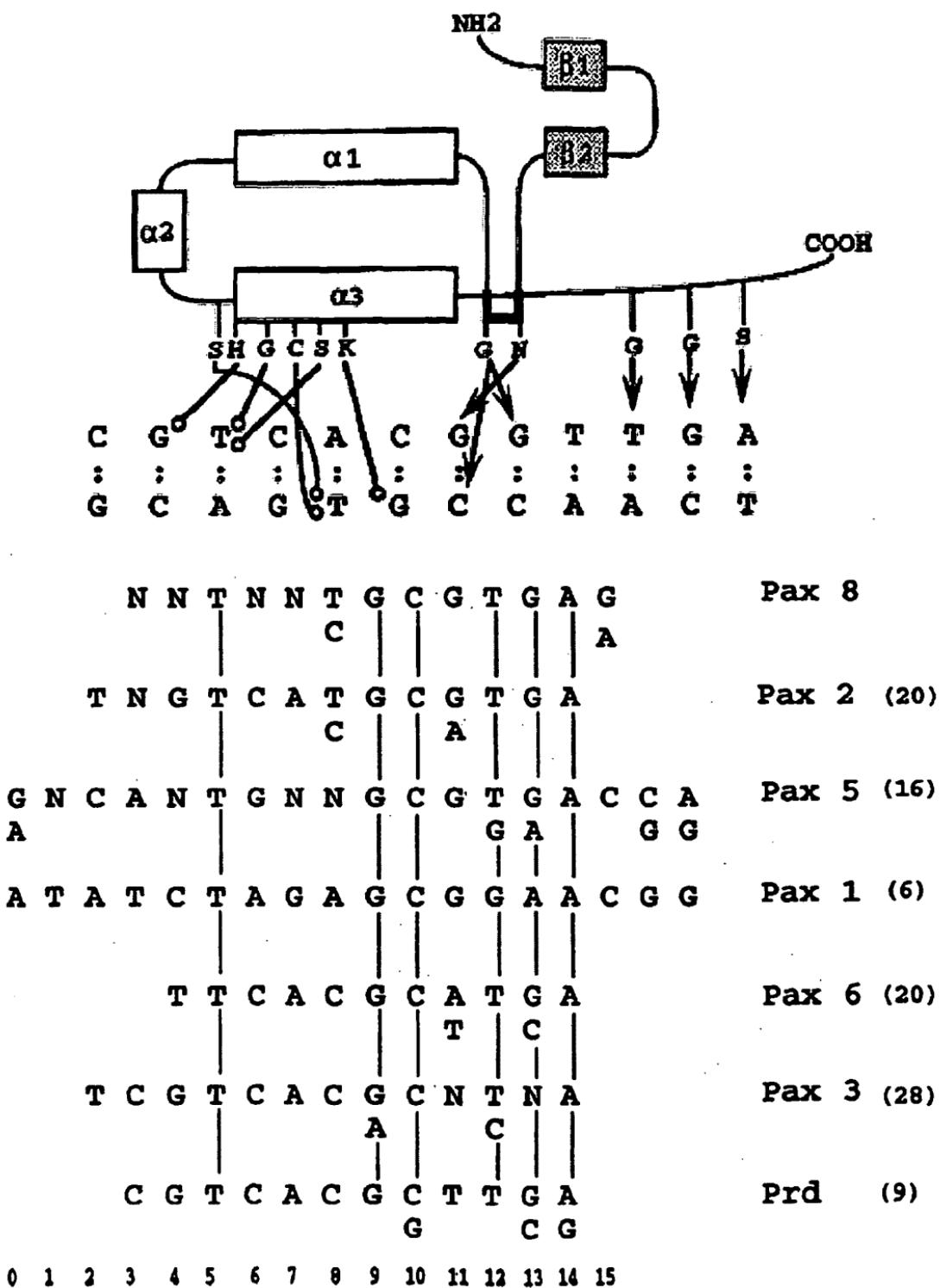


FIG 17

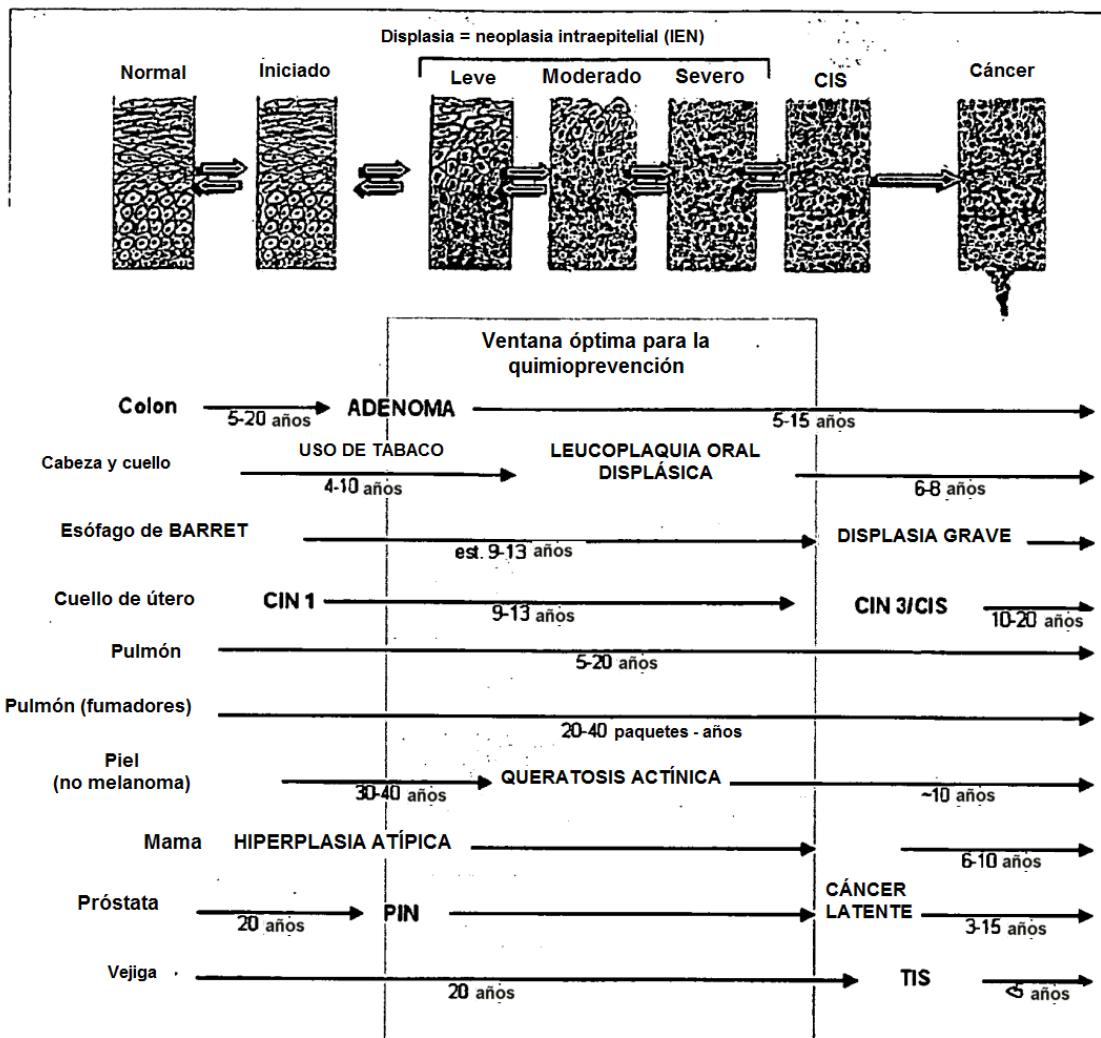


FIG 18

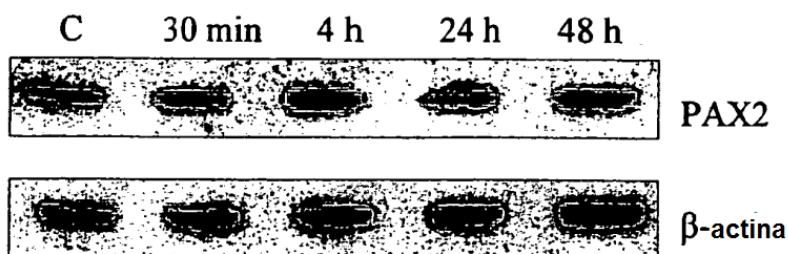


FIG 19

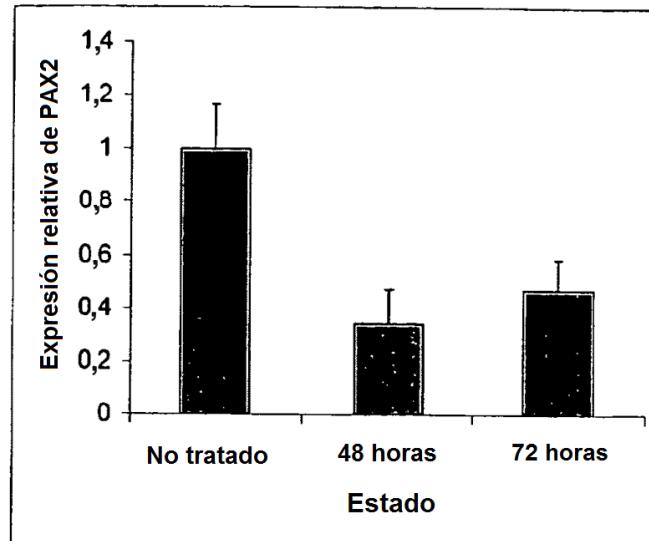


FIG 20A

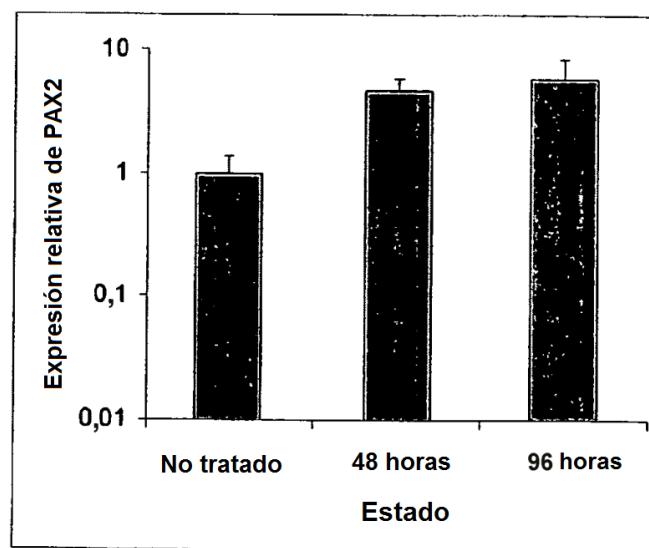


FIG 20B

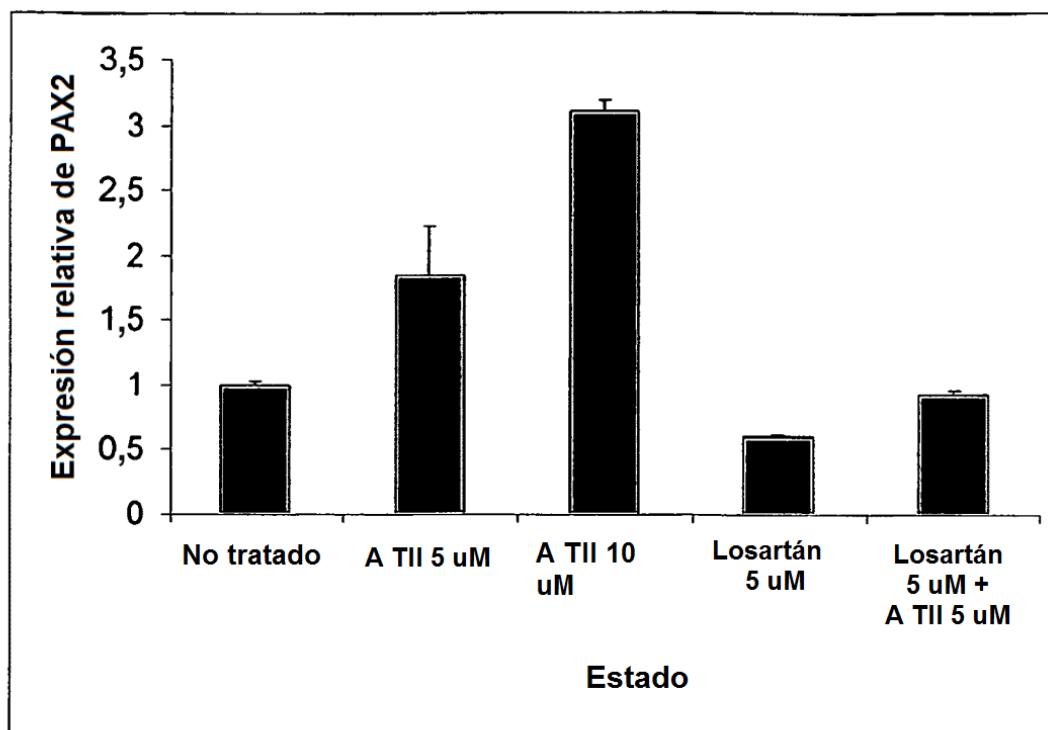


FIG 21

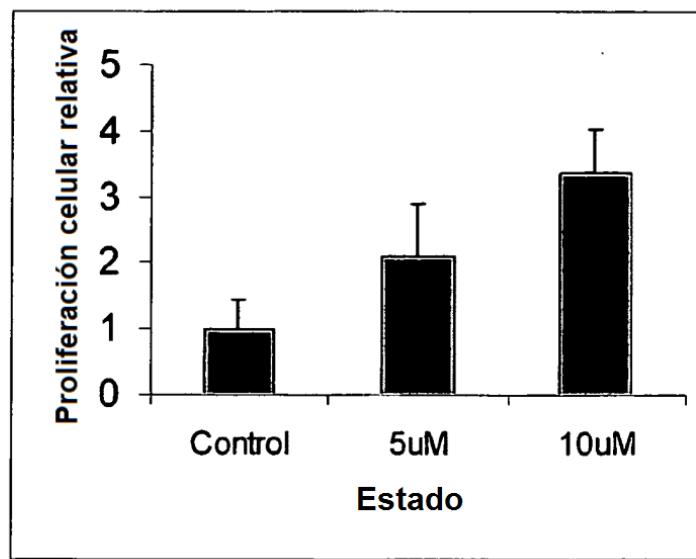


FIG 22

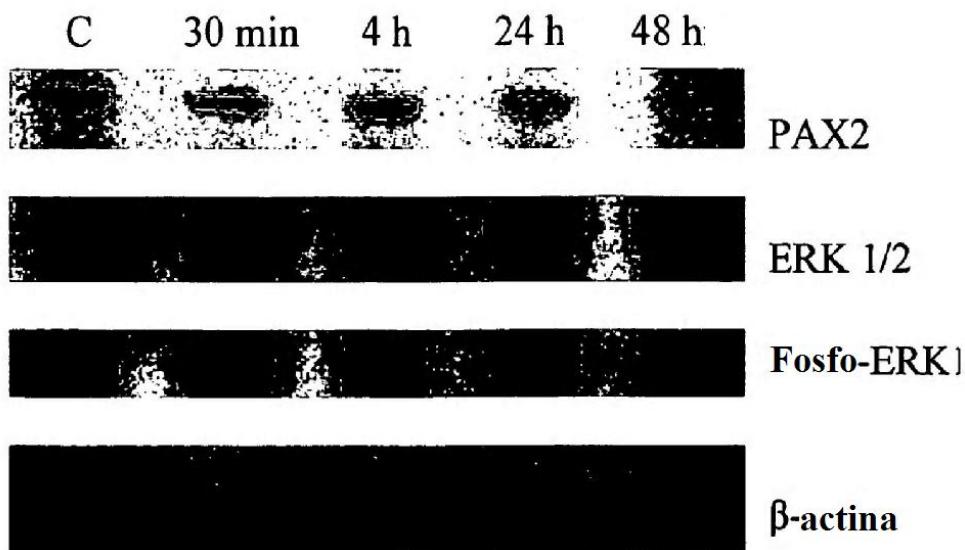


FIG 23A

Control Los AngII PD9850 U0126 AICAR



FIG 23B

Control Los U0126 PD9850 AICAR

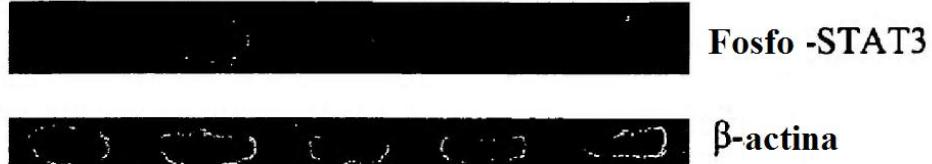
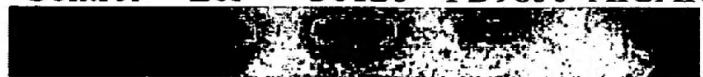


FIG 23C

Control Los U0126 PD9850 AICAR



Fosfo -PAX2



β-actina

FIG 24A

Control U0126 Los AngII AngII
5uM 10uM



Fosfo -JNK



β-actina

FIG 24B

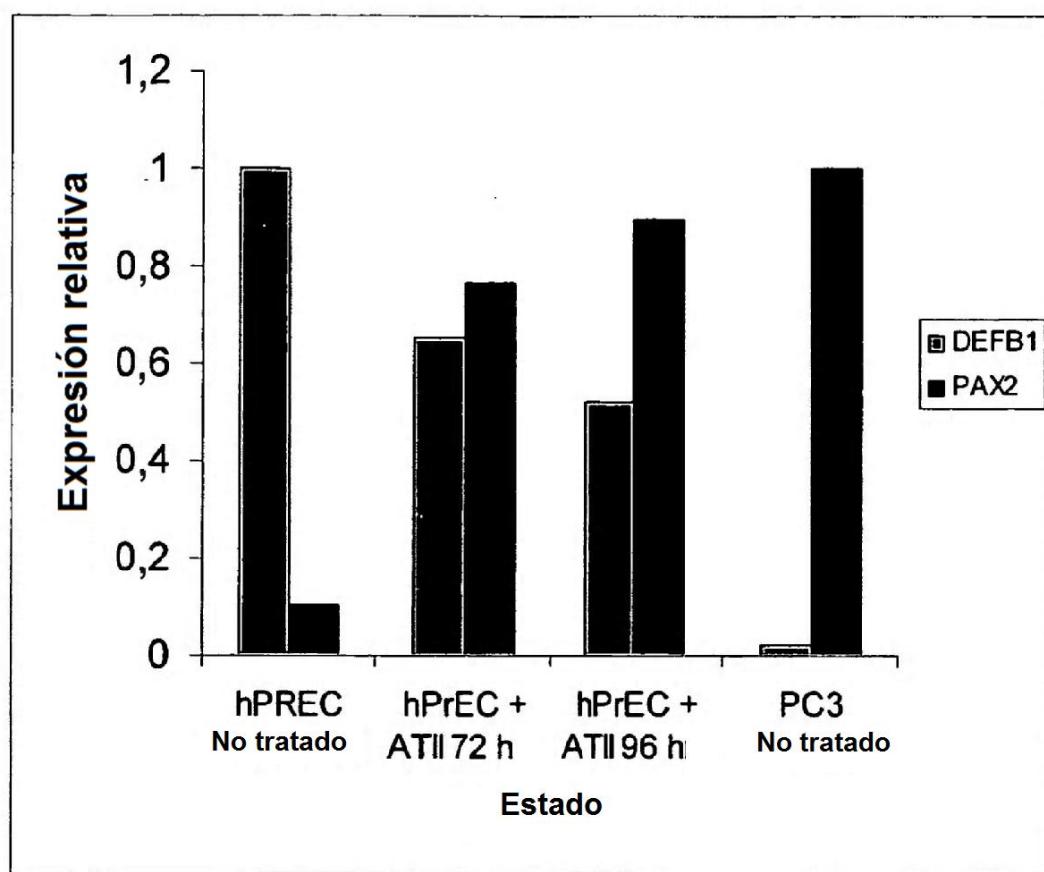
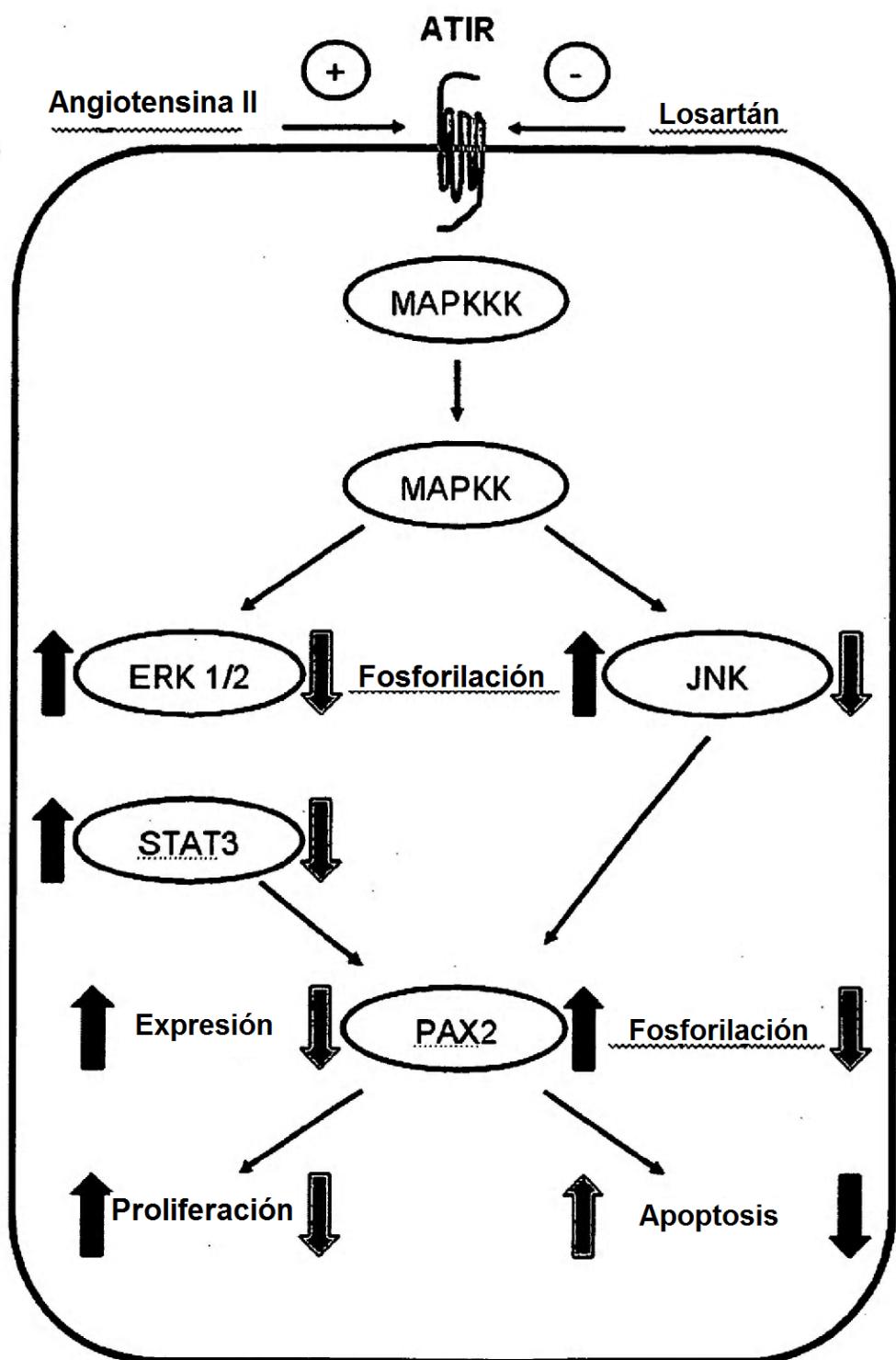
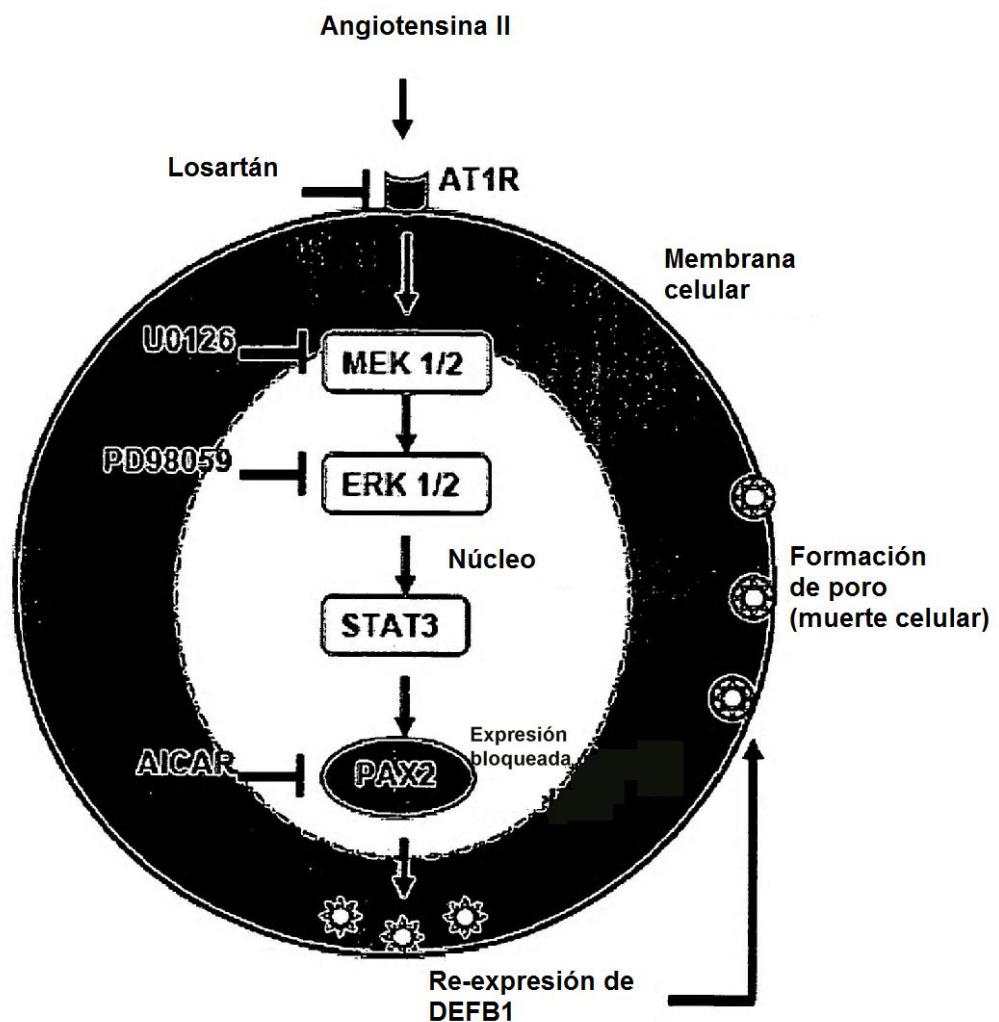


FIG 25

**FIG 26**

**FIG 27**

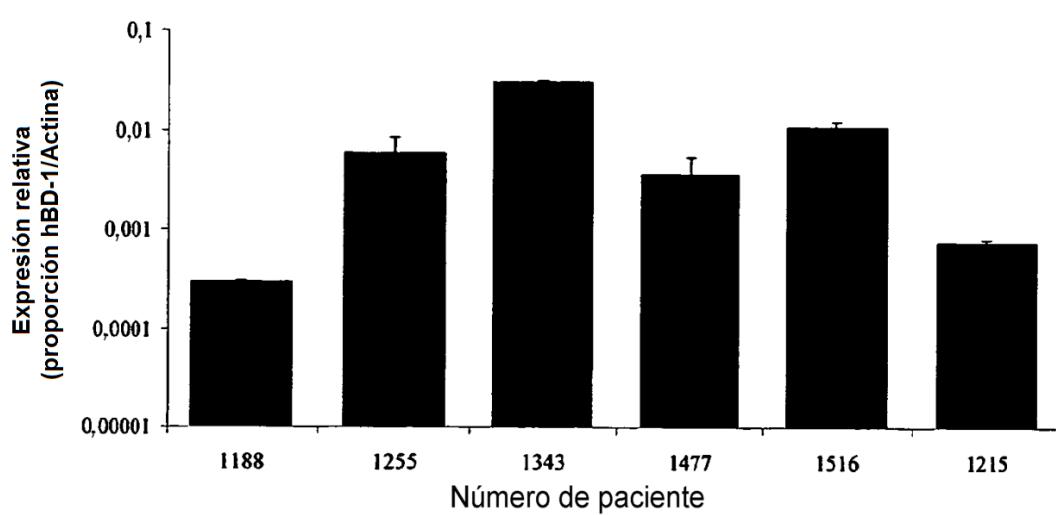
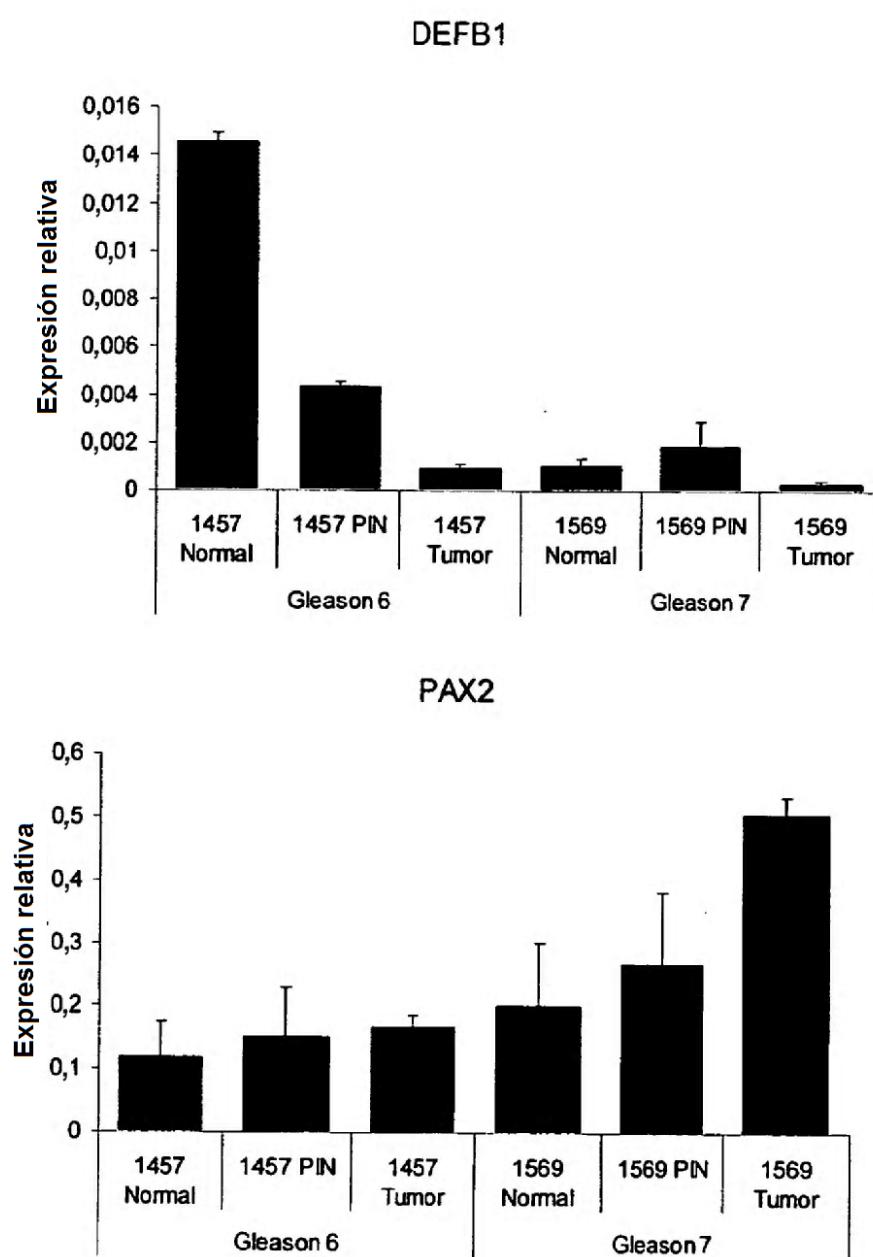


FIG 28

**FIG 29**

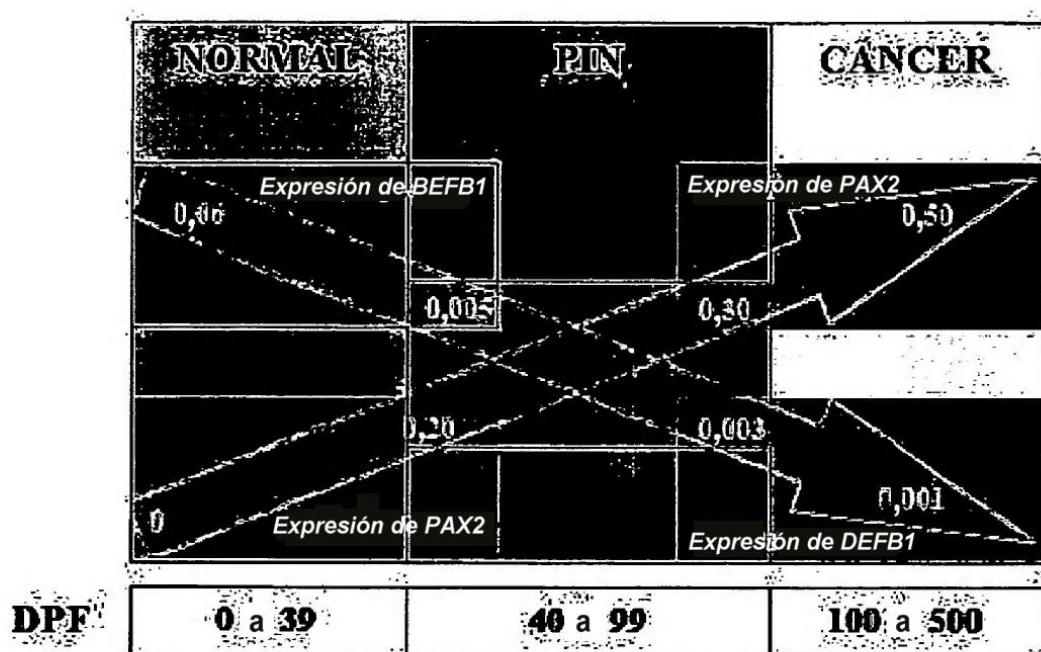


FIG 30

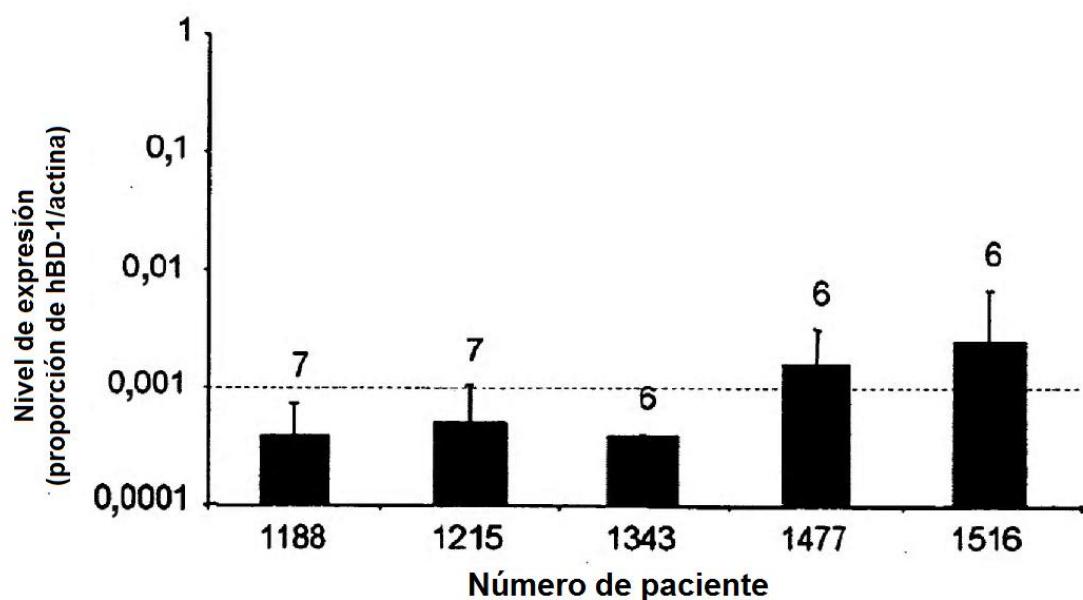


FIG 31A

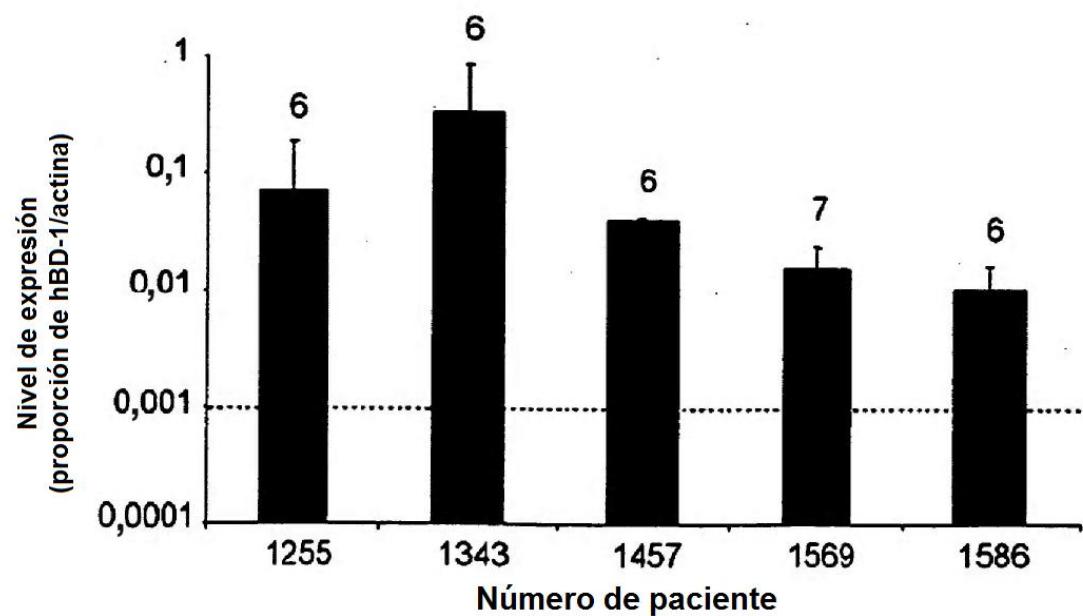


FIG 31B

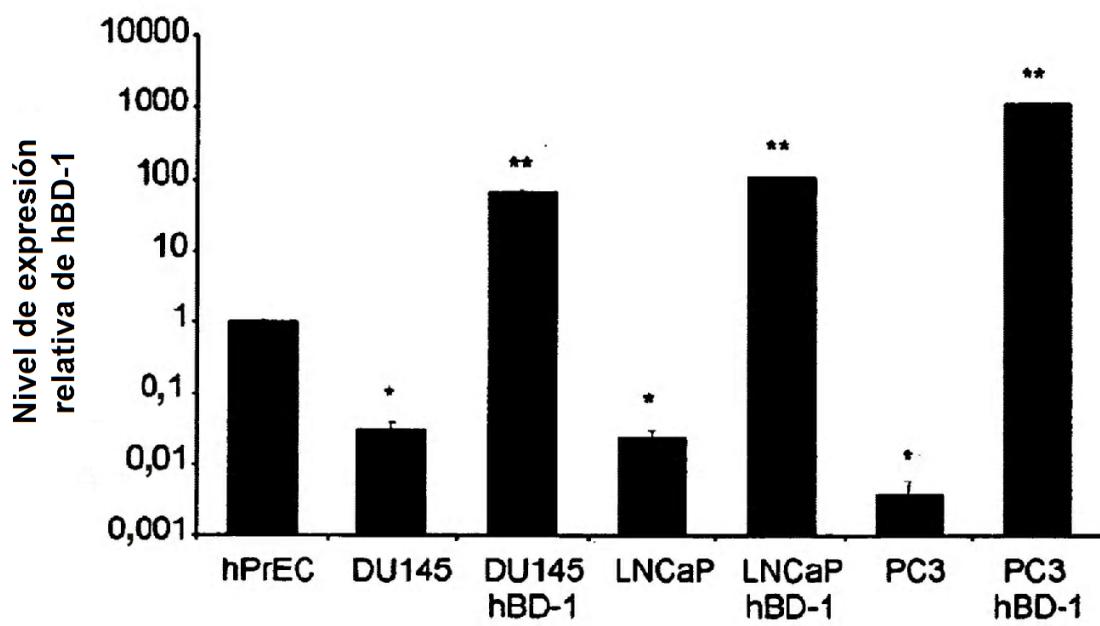


FIG 32A

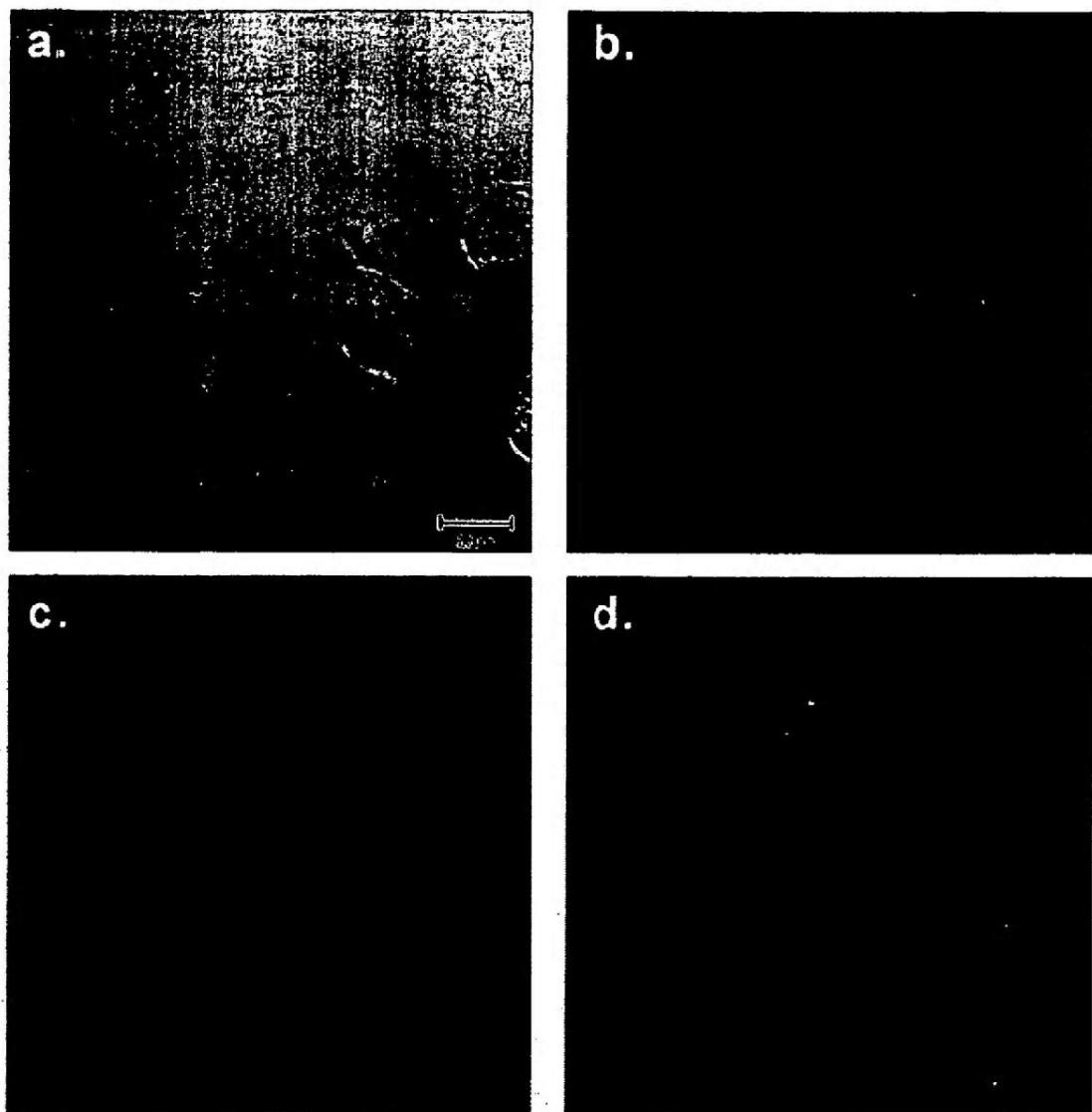


FIG 32B

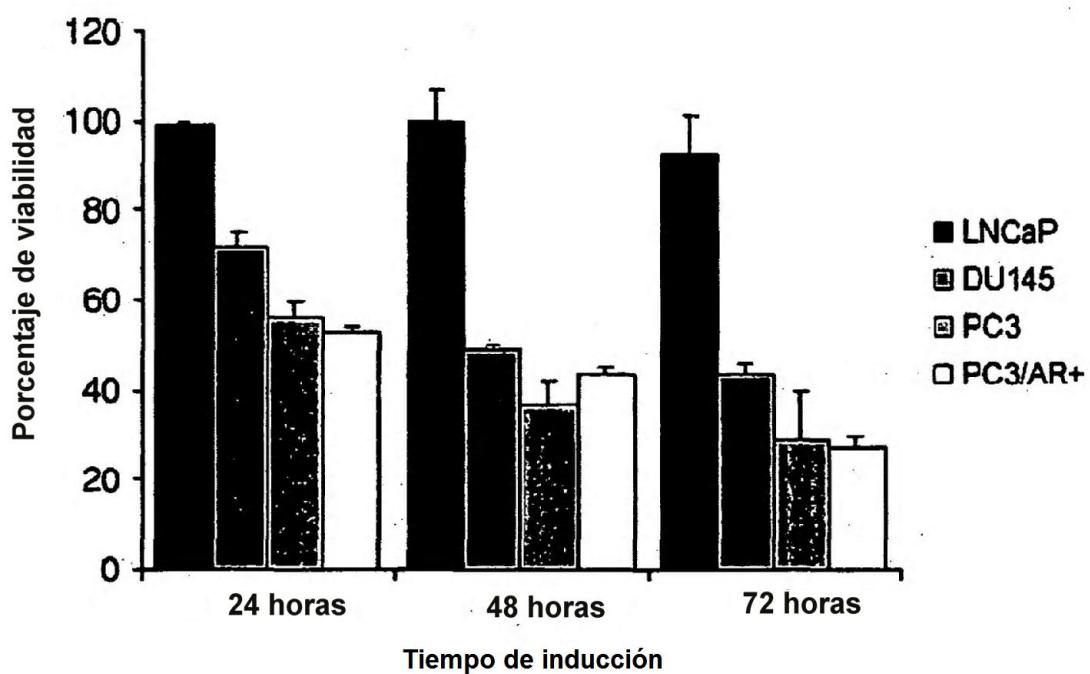
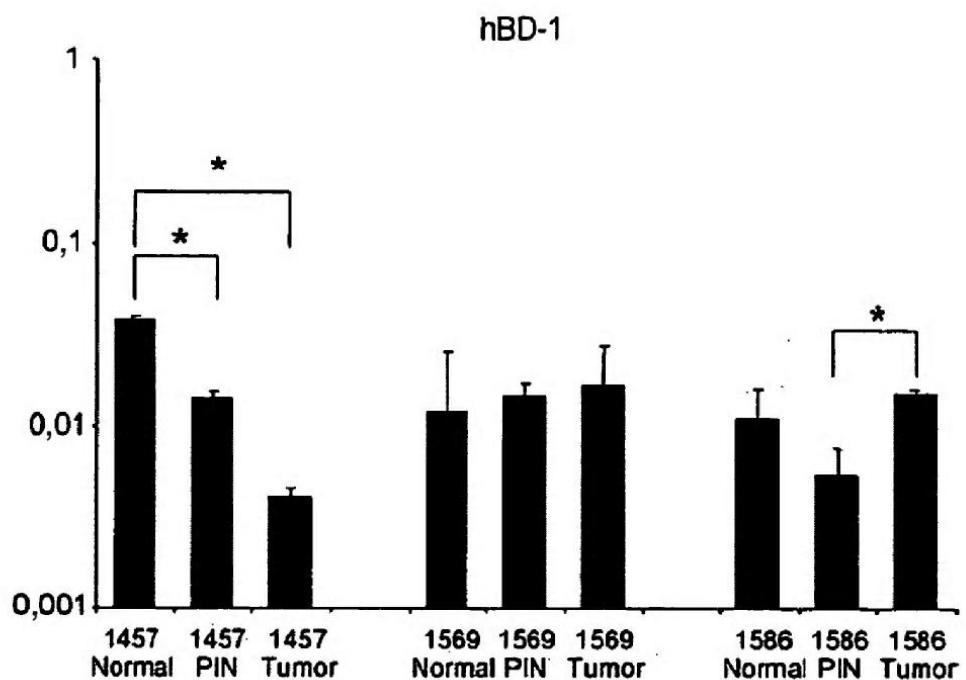
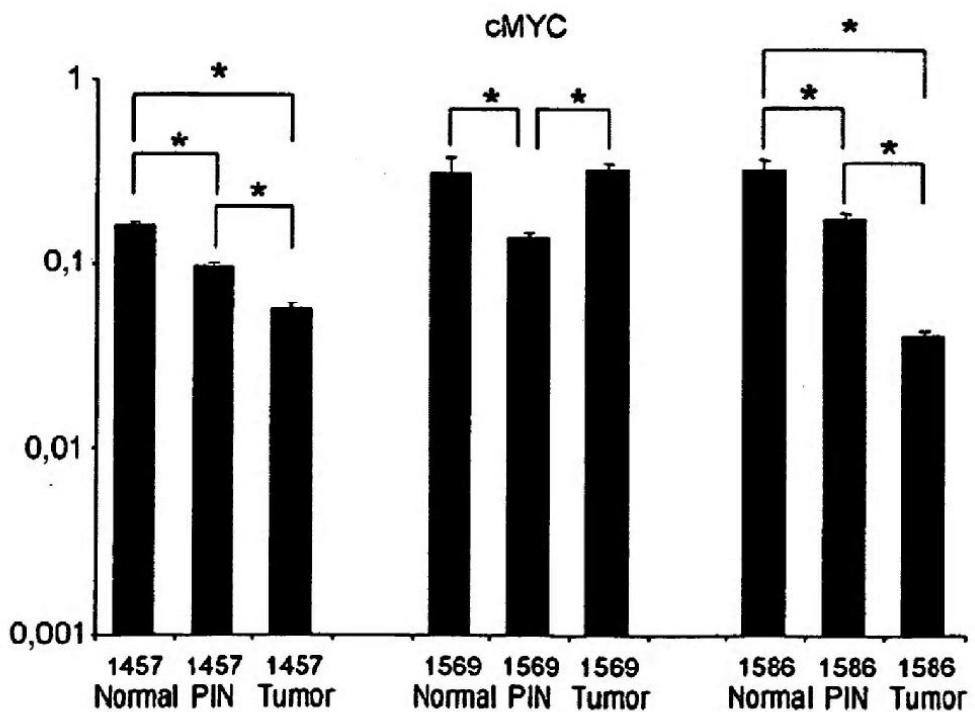


FIG 33

**FIG 34A****FIG 34B**

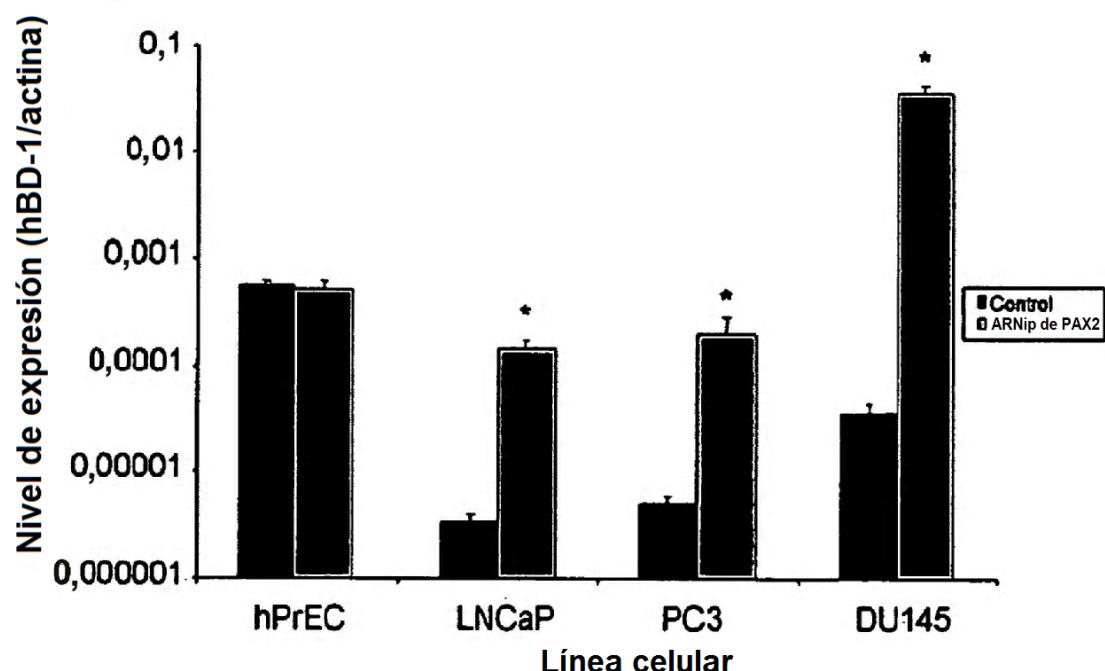


FIG 35

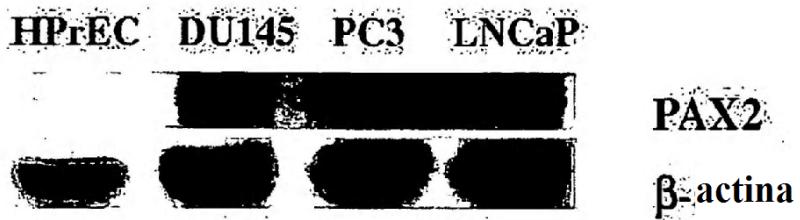


FIG 36A

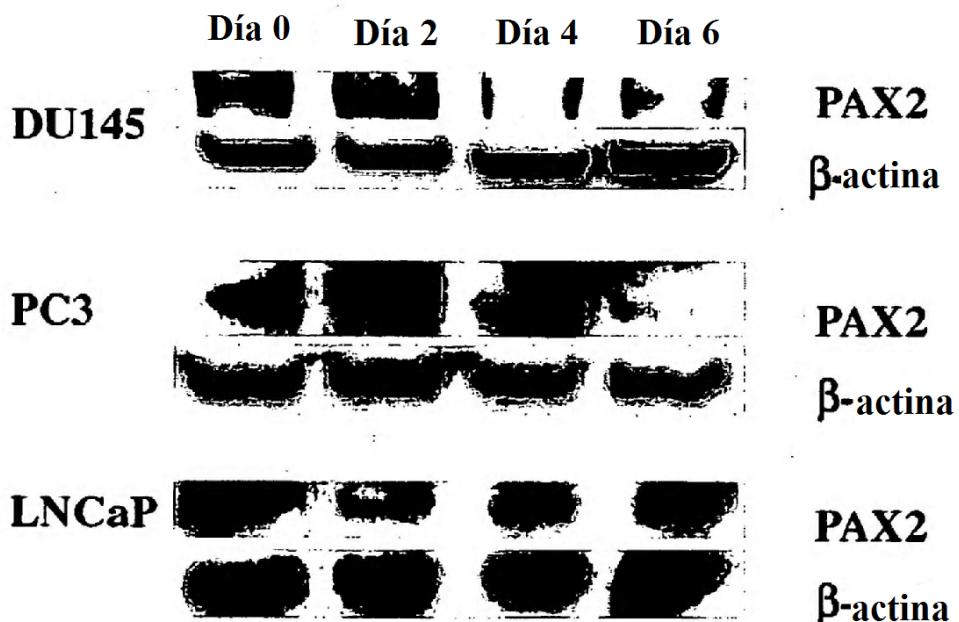


FIG 36B

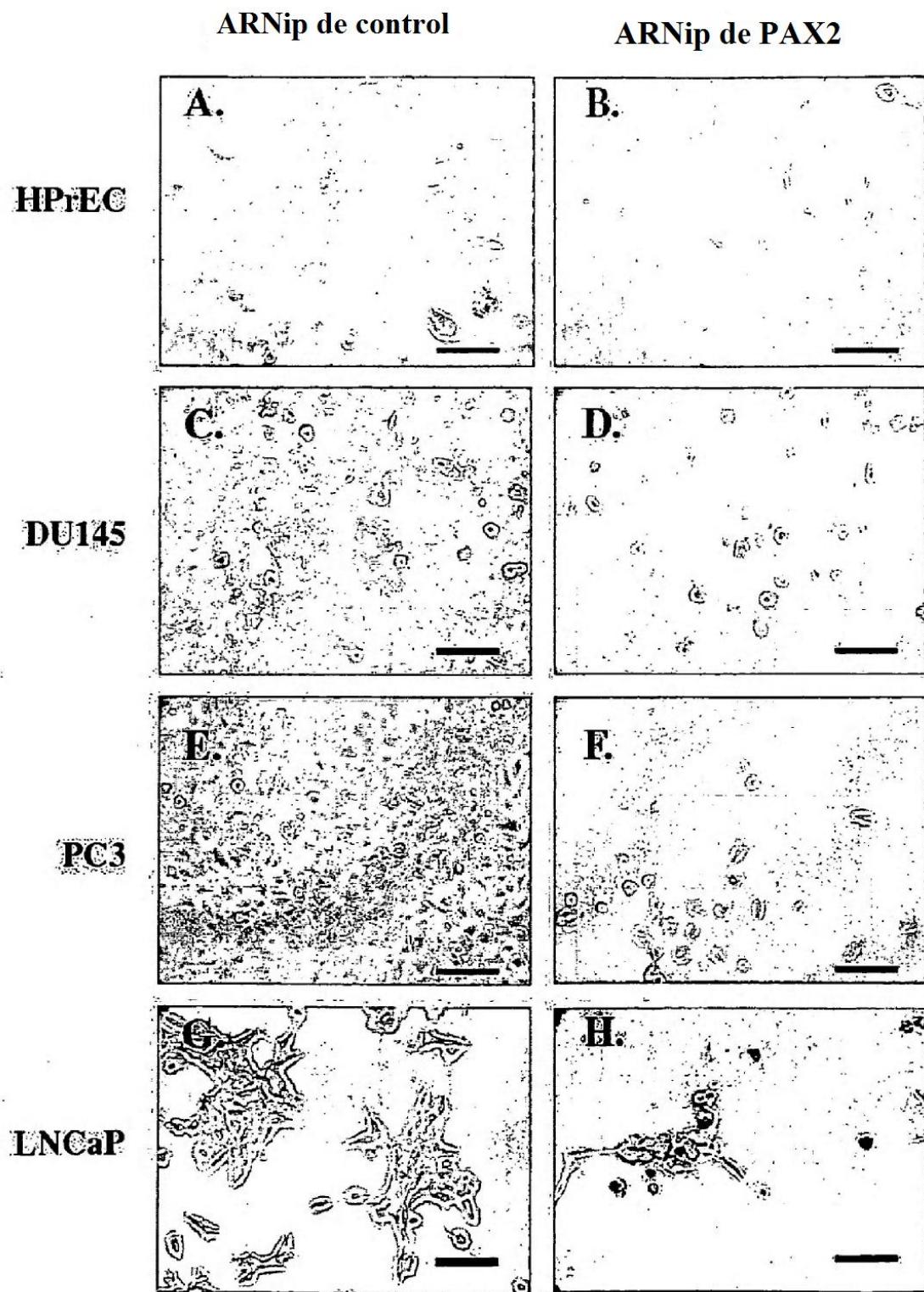


FIG 37

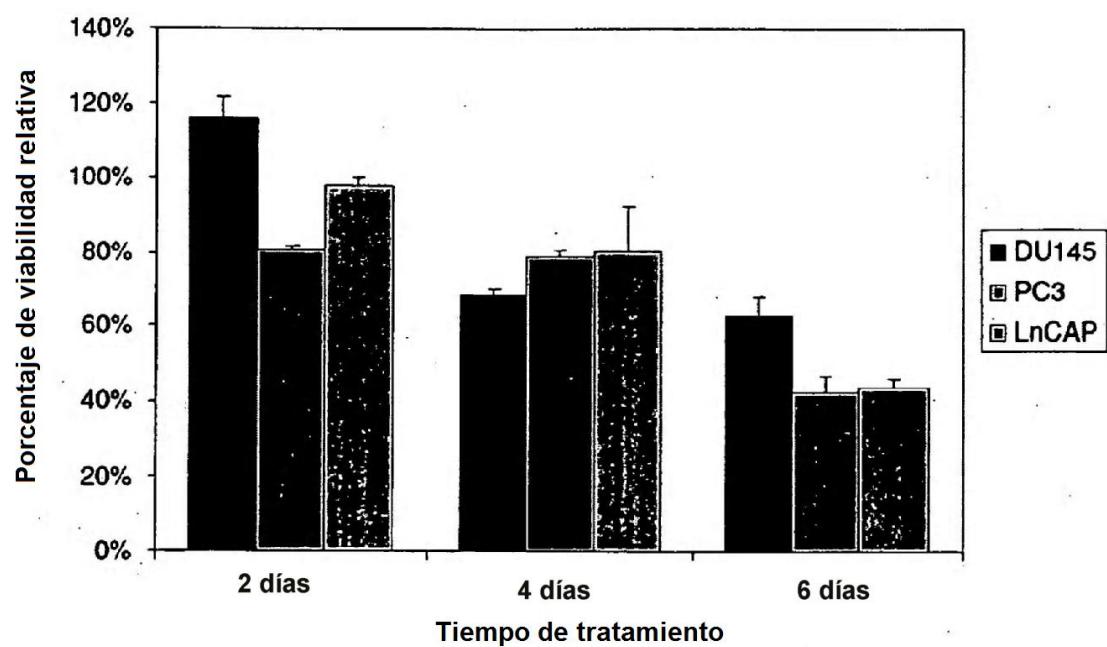
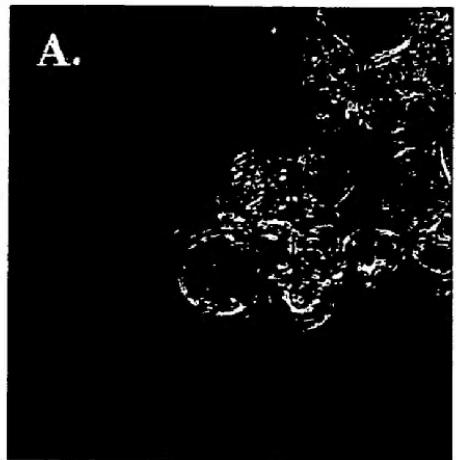
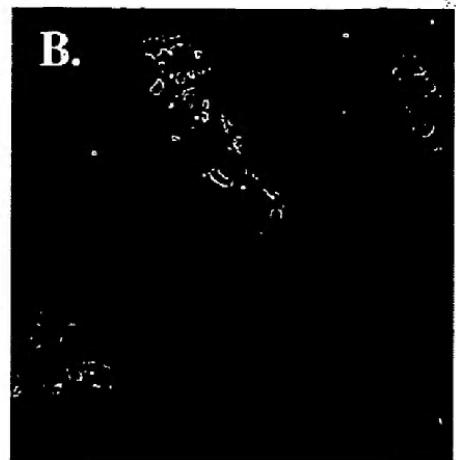


FIG 38

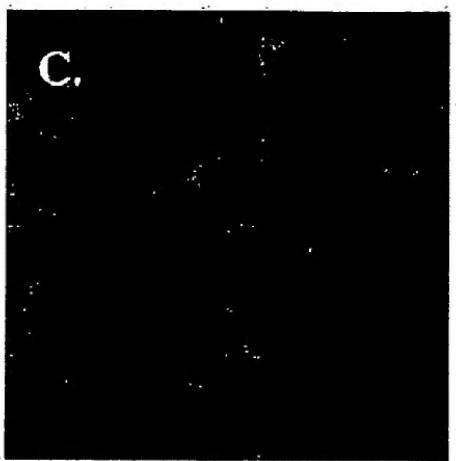
No tratado



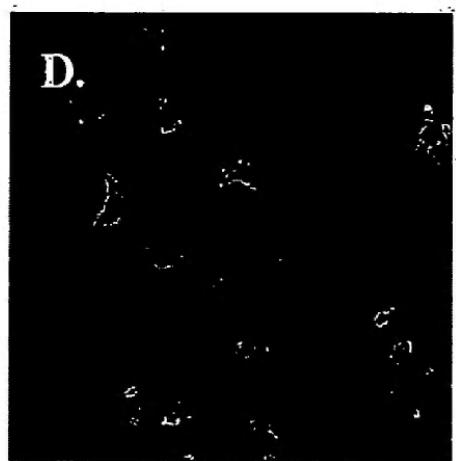
Tratado



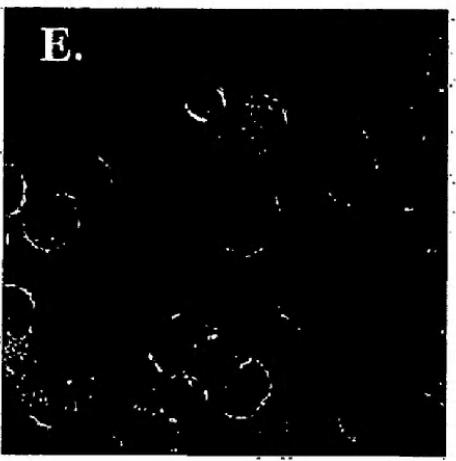
LNCaP



D.

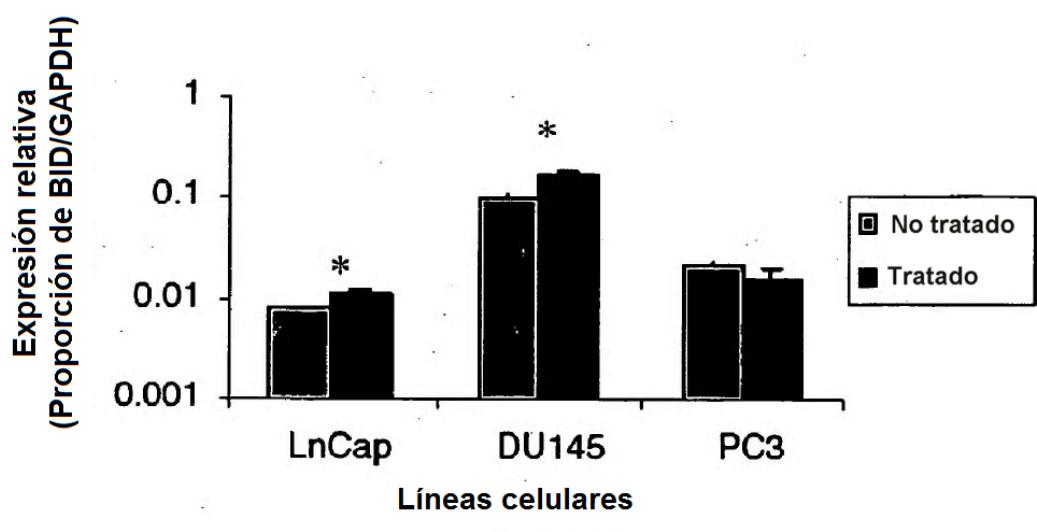
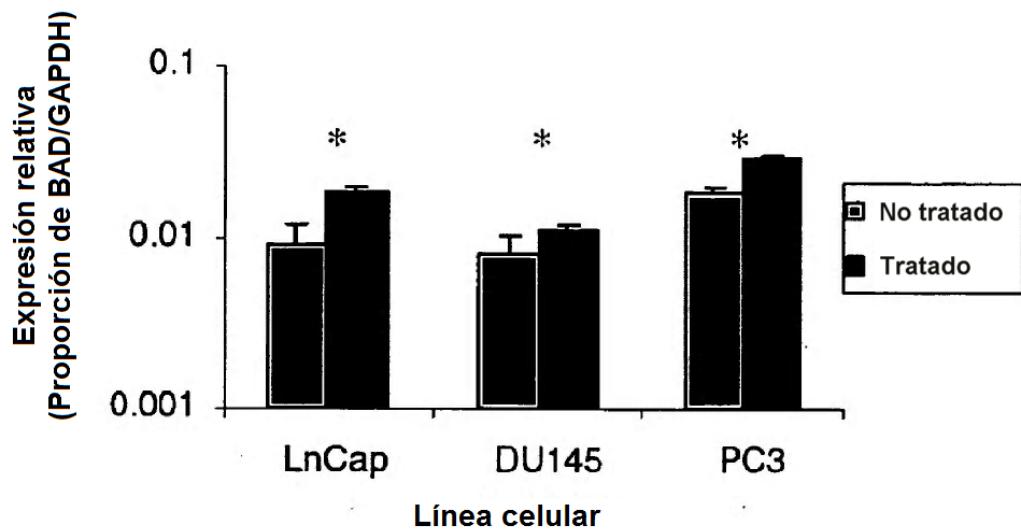


DU145



E.

FIG 39



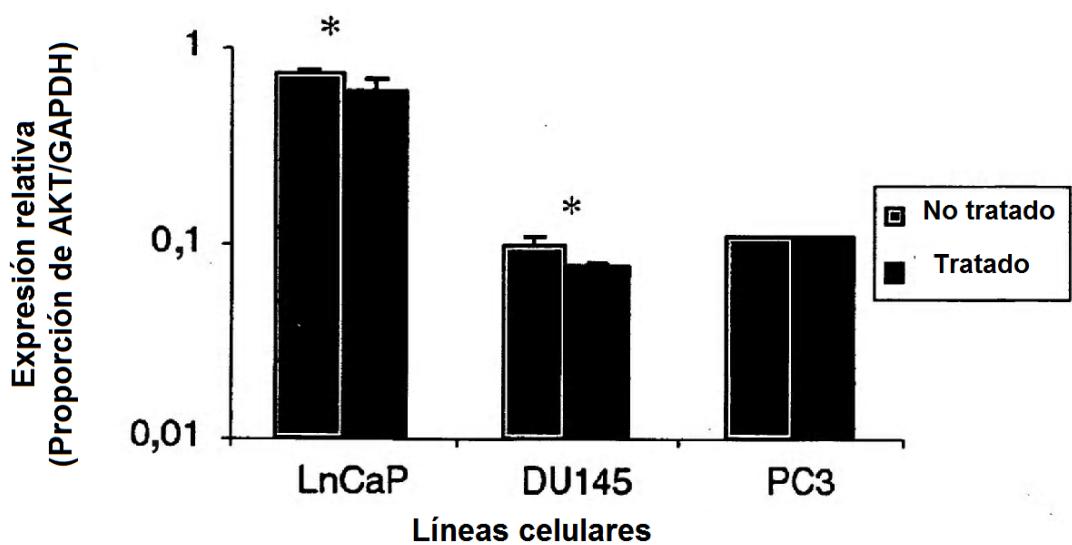


FIG 40C

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

10

- US 3817837 A [0092]
- US 3850752 A [0092]
- 15 • US 3939350 A [0092]
- US 3996345 A [0092]
- US 4277437 A [0092]
- US 4275149 A [0092]
- 20 • US 4366241 A [0092]
- US 4452901 A [0107]
- US 5424000 A [0112]
- US 4376110 A [0116]
- 25 • US 4816567 A [0149] [0151] [0159]
- US 5804440 A, Burton [0151]
- US 6096441 A, Barbas [0151]
- WO 9429348 A [0152]
- 30 • US 4342566 A [0152]
- US 5565332 A, Hoogenboom [0159] [0239] [0243]
- US 5721367 A, Kay [0159]
- US 5837243 A, Deo [0159]
- 35 • US 5939598 A, Kucherlapati [0159]
- US 6130364 A, Jakobovits [0159]
- US 6180377 B, Morgan [0159]
- US 5135917 A [0182]
- 40 • US 5294533 A [0182]
- US 5627158 A [0182]
- US 5641754 A [0182]
- US 5691317 A [0182]
- 45 • US 5780607 A [0182]
- US 5786138 A [0182]
- US 5849903 A [0182]
- US 5856103 A [0182]
- 50 • US 5919772 A [0182]
- US 5955590 A [0182]
- US 5990088 A [0182]
- US 5994320 A [0182]
- 55 • US 5998602 A [0182]
- US 6005095 A [0182]
- US 5543293 A [0183]
- US 5476766 A [0183]
- US 5503978 A [0183]
- US 5731424 A [0183]
- US 5780228 A [0183]
- US 5792613 A [0183]
- US 5795721 A [0183]
- US 5846713 A [0183]
- US 5858660 A [0183]
- US 5861254 A [0183]
- US 5864026 A [0183]
- US 5869641 A [0183]
- US 5958691 A [0183]
- US 6001988 A [0183]
- US 6011020 A [0183]
- US 6013443 A [0183]
- US 6020130 A [0183]
- US 6028186 A [0183]
- US 6030776 A [0183]
- US 6051698 A [0183]
- US 5334711 A [0184]
- US 5436330 A [0184]
- US 5616466 A [0184]
- US 5633133 A [0184]
- US 5646020 A [0184]
- US 5652094 A [0184]
- US 5712384 A [0184]
- US 5770715 A [0184]
- US 5856463 A [0184]
- US 5861288 A [0184]
- US 5891683 A [0184]
- US 5891684 A [0184]
- US 5985621 A [0184]
- US 5989908 A [0184]
- US 5998193 A [0184]
- US 5998203 A [0184]

60

65

- US 6007995 A [0182]
- 5 • US 6013522 A [0182]
- US 6017898 A [0182]
- US 6018042 A [0182]
- US 6025198 A [0182]
- 10 • US 6033910 A [0182]
- US 6040296 A [0182]
- US 6046004 A [0182]
- 15 • US 6046319 A [0182]
- US 6057437 A [0182]
- US 5631146 A [0183]
- US 5580737 A [0183]
- 20 • US 5786462 A [0183]

- US 5688670 A [0184]
- US 5807718 A [0184]
- 25 • US 5910408 A [0184]
- US 5646042 A [0184]
- US 5693535 A [0184]
- US 5731295 A [0184]
- 30 • US 5811300 A [0184]
- US 5837855 A [0184]
- US 5869253 A [0184]
- US 5877021 A [0184]
- 35 • US 5877022 A [0184]
- US 5972699 A [0184]
- US 5972704 A [0184]
- 40 • US 5989906 A [0184]
- US 6017756 A [0184]
- US 5176996 A [0185]
- US 5645985 A [0185]
- 45 • US 5650316 A [0185]
- US 5683874 A [0185]
- US 5693773 A [0185]
- US 5834185 A [0185]
- 50 • US 5869246 A [0185]
- US 5874566 A [0185]
- US 5962426 A [0185]
- WO 9203566 A, Yale, and Forster [0186]
- 55 • WO 9322434 A, Yale [0187]
- WO 9524489 A, Yale [0187]
- US 5168053 A [0187]

- WO 9858058 A, Ludwig and Sproat [0184]
- WO 9858057 A, Ludwig and Sproat [0184]
- WO 9718312 A, Ludwig and Sproat [0184]
- US 5631115 A [0184]
- US 5646031 A [0184]
- US 5683902 A [0184]
- US 5856188 A [0184]
- US 5866701 A [0184]
- US 5869339 A [0184]
- US 6022962 A [0184]
- US 5595873 A [0184]
- US 5652107 A [0184]
- US 5580967 A [0184]

- US 5677195 A [0243]
- US 5683899 A [0243]
- US 5688696 A [0243]
- US 5688997 A [0243]
- US 5698685 A [0243] [0244]
- US 5712146 A [0243] [0244]
- US 5721099 A [0243] [0244]
- US 5723598 A [0243]
- US 5741713 A [0243]
- US 5792431 A [0243]
- US 5807683 A [0243]
- US 5807754 A [0243]
- US 5821130 A [0243] [0244]
- US 5831014 A [0243] [0244]
- US 5834195 A [0243]
- US 5834318 A [0243]
- US 5834588 A [0243]
- US 5840500 A [0243] [0244]
- US 5847150 A [0243] [0244]
- US 5856107 A [0243] [0244]
- US 5856496 A [0243] [0244]
- US 5859190 A [0243] [0244]
- US 5864010 A [0243]
- US 5874443 A [0243]
- US 5877214 A [0243]
- US 5880972 A [0243]
- US 5886126 A [0243]
- US 5886127 A [0243]

- US 5624824 A [0187]
 - US 5683873 A [0187]
 - 5 • US 5728521 A [0187]
 - US 5869248 A [0187]
 - US 5877162 A [0187]
 - 10 • WO 0244321 A [0189]
 - US 4868116 A [0195]
 - US 4980286 A [0195]
 - 15 • WO 9002806 A [0195]
 - WO 8907136 A [0195]
 - US 6261834 B [0202]
 - 20 • US 4897355 A [0208]
 - US 6031071 A [0239]
 - US 5824520 A [0239]
 - US 5596079 A [0239]
 - 25 • US 5084824 A [0243]
 - US 5288514 A [0243] [0244]
 - US 5449754 A [0243]
 - US 5506337 A [0243] [0244]
 - 30 • US 5539083 A [0243]
 - US 5545568 A [0243]
 - US 5556762 A [0243]
 - US 5565324 A [0243]
 - 35 • US 5573905 A [0243]
 - US 5618825 A [0243] [0244]
 - US 5619680 A [0243]
 - US 5627210 A [0243]
 - 40 • US 5646285 A [0243]
 - US 5663046 A [0243]
 - US 5670326 A [0243]
- US 5891737 A [0243]
 - US 5916899 A [0243] [0244]
 - US 5919955 A [0243] [0244]
 - US 5925527 A [0243] [0244]
 - US 5939268 A [0243]
 - 10 • US 5942387 A [0243] [0244]
 - US 5945070 A [0243]
 - US 5948696 A [0243] [0244]
 - US 5958702 A [0243]
 - 15 • US 5958792 A [0243] [0244]
 - US 5962337 A [0243] [0244]
 - US 5965719 A [0243] [0244]
 - US 5972719 A [0243] [0244]
 - 20 • US 5976894 A [0243] [0244]
 - US 5980704 A [0243]
 - US 5985356 A [0243]
 - US 5999086 A [0243]
 - 25 • US 6001579 A [0243]
 - US 6004617 A [0243]
 - US 6008321 A [0243]
 - US 6017768 A [0243] [0244]
 - US 6025371 A [0243] [0244]
 - 30 • US 6030917 A [0243]
 - US 6040193 A [0243]
 - US 6045671 A [0243]
 - US 6045755 A [0243]
 - 35 • US 6060596 A [0243]
 - US 6061636 A [0243]
 - US 3610795 A [0259]

45 **Literatura diferente de patentes citadas en la descripción**

- Davies et al. *Hum. Mol. Gen.*, vol. 13 (2), 235 [0073] [0398]
- 50 • Muratovska et al. Paired-Box genes are frequently expressed in cancer and often required for cancer cell survival. *Oncogene*, 2003, vol. 22, 7989-7997 [0074]
- Fonsato V. et al. *Am J Pathol.*, 2006, vol. 168 (2), 706-1 [0075]
- 55 • Hueber et al. *Kidney Int.*, 2006 [0075]
- Maggio et al. *Enzyme-Immunoassay*, 1987 [0090]
- 60 • Enzyme Immunoassays: Heterogeneous and Homogeneous Systems. Nakamura et al. *Handbook of Experimental Immunology*, Vol. 1: Immunochemistry. 1986, vol. 1, 27.1-27.20 [0090]
- Zoller, M.J. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1992, vol. 3, 348-354 [0153]
- Cole et al. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*. Alan R. Liss, 1985, 77 [0155]
- Boerner et al. *J. Immunol.*, 1991, vol. 147 (1), 86-95 [0155]
- Hoogenboom et al. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0155]
- Marks et al. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581 [0155]
- Jakobovits et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 2551-255 [0156]
- Jakobovits et al. *Nature*, 1993, vol. 362, 255-258 [0156]
- Bruggermann et al. *Year in Immunol.*, 1993, vol. 7,

- O'Farrell, P.H. High Resolution Two-dimensional Electrophoresis of Proteins. *J. Biol. Chem.*, 1975, vol. 250, 4007-4021 [0105]
- Anderson, L ; Anderson, NG. High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1977, vol. 74, 5421-5425 [0105]
- Ornstein, L. Disc electrophoresis, L. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1964, vol. 121, 321-349 [0105]
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, 680 [0106]
- D.M. Bollag et al. Protein Methods. 1996 [0107]
- E. Harlow ; D. Lane. Antibodies, a Laboratory Manual. 1988 [0107]
- Ornstein L. Disc electrophoresis - I: Background and theory. *Ann. NY Acad. Sci.*, 1964, vol. 121, 321-349 [0110]
- Matsudaira, PT ; DR Burgess. SDS microslab linear gradient polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, 1987, vol. 87, 386-396 [0110]
- Neuhoff et al. *Electrophoresis*, 1985, vol. 6, 427-448 [0112]
- Neuhoff et al. *Electrophoresis*, 1988, vol. 9, 255-262 [0112]
- Voller, A. et al. *J. Clin. Pathol.*, 1978, vol. 31, 507-520 [0116]
- Butler, J. E. *Meth. Enzymol.*, 1981, vol. 73, 482-523 [0116]
- Enzyme Immunoassay. CRC Press, 1980 [0116]
- Butler, J. E. Structure of Antigens. CRC Press, 1992, vol. 1, 209-259 [0116]
- Butler, J. E. et al. Immunochemistry. Marcel Dekker, Inc, 1994, 759-803 [0116]
- Immunochemistry of Solid-Phase Immunoassay. CRC Press, 1991 [0116]
- ELISA: Theory and Practice. Crowther. Methods in Molecule Biology. Humana Press, 1995, vol. 42 [0116]
- Morrison et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851-6855 [0149]
- Kohler ; Milstein. *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0150]
- Bernstein, E. et al. *Nature*, 2001, vol. 409, 363-6 [0188]
- Hammond, S.M. et al. *Nature*, 2000, vol. 404, 293-6 [0188]
- Nykanen, A. et al. *Cell*, 2001, vol. 107, 309-21 [0188]
- Martinez, J. et al. *Cell*, 2002, vol. 110, 563-74 [0188]
- Elbashir, S.M. et al. *Nature*, 2001, vol. 411, 494-498 [0156]
- Jones et al. *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0158] [0159]
- Reichmann et al. *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0158]
- Presta. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0158]
- Riechmann et al. *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0159]
- Verhoeven et al. *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0159]
- Smith ; Waterman. *Adv. Appl. Math.*, 1981, vol. 2, 482 [0163]
- Needleman ; Wunsch. *J. Mol. Biol.*, 1970, vol. 48, 443 [0163]
- Pearson ; Lipman. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, vol. 85, 2444 [0163]
- Zuker, M. *Science*, 1989, vol. 244, 48-52 [0164]
- Jaeger et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 7706-7710 [0164]
- Jaeger et al. *Methods Enzymol.*, 1989, vol. 183, 281-306 [0164]
- Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989 [0167]
- Kunkel et al. *Methods Enzymol.*, 1987, vol. 154, 367 [0167]
- Letsinger et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 6553-6556 [0176]
- Altman. *Science*, 1990, vol. 238, 407-409 [0186]
- Yuan et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 8006-8010 [0187]
- Yuan ; Altman. *EMBO J*, 1995, vol. 14, 159-168 [0187]
- Carrara et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1995, vol. 92, 2627-2631 [0187]
- Fire, A. et al. *Nature*, 1998, vol. 391, 806-11 [0188]
- Napoli, C. et al. *Plant Cell*, 1990, vol. 2, 279-89 [0188]
- Hannon, G.J. *Nature*, 2002, vol. 418, 244-51 [0188]
- Elbashir, S.M. et al. *Genes Dev.*, 2001, vol. 15, 188-200 [0188]
- Svensson ; Persson. *J. Virology*, 1985, vol. 55, 442-449 [0198]
- Seth et al. *J. Virol.*, 1984, vol. 51, 650-655 [0198]
- Seth et al. *Mol. Cell. Biol.*, 1984, vol. 4, 1528-1533 [0198]
- Varga et al. *J. Virology*, 1991, vol. 65, 6061-6070 [0198]

- 5 • [0189]
- **Ui-Tei, K.** et al. *FEBS Lett*, 2000, vol. 479, 79-82 [0189]
- 10 • **Wolff, J. A.** et al. *Science*, 1990, vol. 247, 1465-1468 [0191]
- **Wolff, J. A.** *Nature*, 1991, vol. 352, 815-818 [0191]
- 15 • **Ram** et al. *Cancer Res.*, 1993, vol. 53, 83-88 [0192]
- **Verma, I.M.** Retroviral vectors for gene transfer. *Microbiology-1985, American Society for Microbiology*, 1985, 229-232 [0195]
- 20 • **Mulligan**. *Science*, 1993, vol. 260, 926-932 [0195]
- **Berkner** et al. *J. Virology*, 1987, vol. 61, 1213-1220 [0198]
- **Massie** et al. *Mol. Cell. Biol.*, 1986, vol. 6, 2872-2883 [0198]
- 25 • **Haj-Ahmad** et al. *J. Virology*, 1986, vol. 57, 267-274 [0198]
- **Davidson** et al. *J. Virology*, 1987, vol. 61, 1226-1239 [0198]
- 30 • **Zhang**. Generation and identification of recombinant adenovirus by liposome-mediated transfection and PCR analysis. *BioTechniques*, 1993, vol. 15, 868-872 [0198]
- **Morsy**. *J. Clin. Invest.*, 1993, vol. 92, 1580-1586 [0198]
- **Kirshenbaum**. *J. Clin. Invest.*, 1993, vol. 92, 381-387 [0198]
- 35 • **Roessler**. *J. Clin. Invest*, 1993, vol. 92, 1085-1092 [0198]
- **Moullier**. *Nature Genetics*, 1993, vol. 4, 154-159 [0198]
- 40 • **La Salle**. *Science*, 1993, vol. 259, 988-990 [0198]
- **Gomez-Foix**. *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 25129-25134 [0198]
- **Rich**. *Human Gene Therapy*, 1993, vol. 4, 461-476 [0198]
- 45 • **Zabner**. *Nature Genetics*, 1994, vol. 6, 75-83 [0198]
- **Guzman**. *Circulation Research*, 1993, vol. 73, 1201-1207 [0198]
- **Bout**. *Human Gene Therapy*, 1994, vol. 5, 3-10 [0198]
- 50 • **Zabner**. *Cell*, 1993, vol. 75, 207-216 [0198]
- **Caillaud**. *Eur. J. Neuroscience*, 1993, vol. 5, 1287-1291 [0198]
- 55 • **Ragot**. *J. Gen. Virology*, 1993, vol. 74, 501-507 [0198]
- **Chardonnet**; **Dales**. *Virology*, 1970, vol. 40, 462-477 [0198]
- **Brown**; **Burlingham**. *J. Virology*, 1973, vol. 12, 386-396 [0198]
- **Wickham** et al. *Cell*, 1993, vol. 73, 309-319 [0198]
- **Sun** et al. *Nature genetics*, 1994, vol. 8, 33-41 [0205]
- **Cotter**; **Robertson**. *Curr Opin Mol Ther*, 1999, vol. 5, 633-644 [0205]
- **Brigham** et al. *Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol.*, 1989, vol. 1, 95-100 [0208]
- **Felgner** et al. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1987, vol. 84, 7413-7417 [0208]
- **Senter** et al. *Bioconjugate Chem.*, 1991, vol. 2, 447-451 [0210] [0234]
- **Bagshawe**, K.D. *Br. J. Cancer*, 1989, vol. 60, 275-281 [0210] [0234]
- **Bagshawe** et al. *Br. J. Cancer*, 1988, vol. 58, 700-703 [0210] [0234]
- **Senter** et al. *Bioconjugate Chem.*, 1993, vol. 4, 3-9 [0210] [0234]
- **Battelli** et al. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1992, vol. 35, 421-425 [0210] [0234]
- **Pietersz**; **McKenzie**. *Immunolog. Reviews*, 1992, vol. 129, 57-80 [0210] [0234]
- **Roffler** et al. *Biochem. Pharmacol*, 1991, vol. 42, 2062-2065 [0210] [0234]
- **Hughes** et al. *Cancer Research*, 1989, vol. 49, 6214-6220 [0210] [0234]
- **Litzinger**; **Huang**. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1992, vol. 1104, 179-187 [0210] [0234]
- **Brown**; **Greene**. *DNA and Cell Biology*, 1991, vol. 10 (6), 399-409 [0210] [0234]
- **Fiers** et al. *Nature*, 1978, vol. 273, 113 [0217]
- **Greenway**, P.J. et al. *Gene*, 1982, vol. 18, 355-360 [0217]
- **Laimins**, L. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1981, vol. 78, 993 [0218]
- **Lusky**, M.L. et al. *Mol. Cell Bio.*, 1983, vol. 3, 1108 [0218]
- **Banerji**, J.L. et al. *Cell*, 1983, vol. 33, 729 [0218]
- **Osborne**, T.F. et al. *Mol. Cell Bio.*, 1984, vol. 4, 1293 [0218]
- **Southern** P.; **Berg**, P. *J. Molec. Appl. Genet.*, 1982, vol. 1, 327 [0225]
- **Mulligan**, R.C.; **Berg**, P. *Science*, 1980, vol. 209, 1422 [0225]
- **Sugden**, B. et al. *Mol. Cell. Biol.*, 1985, vol. 5, 410-413 [0225]
- Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Mack Publishing Company, 1995 [0227]
- **Szostak**. *TIBS*, 1992, vol. 19, 89 [0238]
- **Roberts R.W.**; **Szostak J.W.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94 (23), 12997-302 [0240]
- **Cohen B.A.** et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95 (24), 14272-7 [0241]

- Fields ; Song. *Nature*, 1989, vol. 340, 245-6 [0241]
- Rotivinen et al. *Acta Pharmaceutica Fennica*, 1988, vol. 97, 159-166 [0253]
- 5 • Ripka. *New Scientist*, 16 June 1988, 54-57 [0253]
- McKinlay ; Rossmann. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1989, vol. 29, 111-122 [0253]
- 10 • Perry ; Davies. QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design. Alan R. Liss, Inc, 1989, 189-193 [0253]
- Lewis ; Dean. *Proc. R. Soc. Lond.*, 1989, vol. 236, 125-140141-162 [0253]
- 15 • Askew et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, vol. 111, 1082-1090 [0253]
- Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0266]
- 20 • Ikuta et al. *Ann. Rev. Biochem.*, 1984, vol. 53, 323-356 [0266]
- Narang et al. *Methods Enzymol.*, 1980, vol. 65, 610-620 [0266]
- 25 • Nielsen et al. *Bioconjug. Chem.*, 1994, vol. 5, 3-7 [0266]
- Grant GA. Synthetic Peptides: A User Guide. W.H. Freeman and Co, 1992 [0267]
- 30 • Bodansky M ; Trost B. Principles of Peptide Synthesis. Springer-Verlag Inc, 1993 [0267]
- Abrahmsen L et al. *Biochemistry*, 1991, vol. 30, 4151 [0268]
- 35 • Dawson et al. Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. *Science*, 1994, vol. 266, 776-779 [0268]
- Baggolini M et al. *FEBS Lett.*, 1992, vol. 307, 97-101 [0268]
- Clark-Lewis I et al. *J.Biol.Chem.*, 1994, vol. 269, 40 16075 [0268]
- Clark-Lewis I et al. *Biochemistry*, 1991, vol. 30, 3128 [0268]
- Rajarathnam K et al. *Biochemistry*, 1994, vol. 33, 6623-30 [0268]
- 45 • Schnolzer, M et al. *Science*, 1992, vol. 256, 221 [0269]
- deLisle Milton RC et al. Techniques in Protein Chemistry IV. Academic Press, 1992, 257-267 [0269]
- 50 • Ady N ; Morat L ; Fizazi K ; Soria JC ; Mathieu MC ; Prapotnick D ; Sabatier L ; Chauveinc L. Detection of HER-2/neu-positive circulating epithelial cells in prostate cancer patients. *Br J Cancer*, 2004, vol. 90, 443-448 [0398]
- 55 • Bals R ; Goldman MJ ; Wilson JM. Mouse beta-defensin 1 is a salt-sensitive antimicrobial peptide present in epithelia of the lung and urogenital tract. *Infect Immun.*, March 1998, vol. 66 (3), 1225-32 [0398]
- 60 • Banchereau, J. ; Palucka, A. K. ; Dhodapkar, M. ; Burkeholder, S. ; Taquet, N. ; Rolland, A. ; Taquet, S. ; Coquery, S. ; Wittkowski, K. M. ; Bhardwaj, N. Immune and Clinical Responses in Patients with Metastatic Melanoma to CD34+ Progenitor-derived Dendritic Cell Vaccine. *Cancer Res*, 2001, vol. 61 (17), 6451-6458 [0398]
- Bensch KW ; Raida M ; Magert HJ ; Schulz-Knappe P ; Forssmann WG. hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett.*, 17 July 1995, vol. 368 (2), 331-5 [0398]
- The staging and grading of prostatic cancer. Benson ; Olsson. *The Prostate*. 1989, 261-272 [0398]
- Bockmuhl, U. ; Ishwad, C. S. ; Ferrell, R. E. ; Gollin, S. M. Association of 8p23 deletions with poor survival in head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 2001, vol. 124 (4), 451-5 [0398]
- Bodhoven, A.V. et al. Molecular characterization of Human Prostate Carcinoma Cell Lines. *Prostate*, 2003, vol. 57, 205-225 [0398]
- Boyd, K. E. ; Farnham, P. J. Coexamination of site-specific transcription factor binding and promoter activity in living cells. *Mol Cell Biol*, 1999, vol. 19, 8393-8399 [0398]
- Braida, L. ; Boniotto, M. ; Pontillo, A. ; Tovo, P.A. ; Amoroso, A. ; Crovella, S. A singlenucleotide polymorphism in the human beta-defensin 1 gene is associated with HIV-1 infection in Italian children. *Aids*, 2004, vol. 18, 1598-1600 [0398]
- Discenza, M.T. ; He, S. ; Lee, T.H. ; Chu, L.L. ; Bonlon, B. ; Goodyer, P. ; Eccles, Buttiglieri, S. ; De-regibus, M. C. ; Bravo, S. ; Cassoni, P. Role of PAX2 in apoptosis resistance and proinvasive phenotype of Kaposi's sarcoma cells. *J Biol Chem*, 2004, vol. 279 (6), 4136-43 [0398]
- Carroll, A.G. et al. p53 oncogene mutations in three human prostate cancer cell lines. *Prostate*, 1993, vol. 23 (2), 123-134 [0398]
- Catalano, M. G. ; Pfetter, U. ; Raineri, M. ; Ferro, P. ; Curto, A. ; Capuzzi, P. ; Corbo, F. ; Berta, L. ; Fortunati, N. Altered expression of androgen-receptor isoforms in human colon-cancer tissues. *Int J Cancer*, 2000, vol. 86 (3), 325-30 [0398]
- Chaib, H. ; MacDonald, J. W. ; Vessella, R. L. ; Washburn, J. G. ; Quinn, J. E. ; Odman, A. ; Rubin, M. A. ; Macoska, J. A. Haploinsufficiency and reduced expression of genes localized to the 8p chromosomal region in human prostate tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 2003, vol. 37 (3), 306-13 [0398]
- Coultras, L. ; Strasser, A. The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin Cancer Biol*, 2003, vol. 13 (2), 115-23 [0398]

- Dearnaley DP ; Sloane JP ; Ormerod MG ; Steele K ; Coombes RC ; Clink HM ; Powles TJ ; Ford HT ; Gaze JC ; Neville AM. Increased detection of mammary carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen. *Br J Cancer*, 1981, vol. 44, 85-90 [0398]
- Dhebi, M. et al. The paired-box transcription factor, PAX2, positively modulates expression of the Wilms' tumor suppressor gene (WT1). *Oncogene*, 1996, vol. 13, 447-453 [0398]
- Discenza, M. T. ; He, S. ; Lee, T. H. ; Chu, L. L. ; Bolon, B. ; Goodyer, P. ; Eccles, M. ; Pelletier, J. WT1 is a modifier of the PAX2 mutant phenotype: cooperation and interaction between WT1 and PAX2. *Oncogene*, 2003, vol. 22 (50), 8145-55 [0398]
- Donald, C. D. ; Sun, C. Q. ; Lim, S. D. ; Macoska, J. ; Cohen, C. ; Amin, M. B. ; Young, A. N. ; Ganz, T. A. ; Marshall, F. F. ; Petros, J. A. Cancer-specific loss of beta-defensin 1 in renal and prostatic carcinomas. *Lab Invest*, 2003, vol. 83 (4), 501-5 [0398]
- Dorfler, P. et al. C-terminal activating and inhibitory domains determine the transactivation potential of BSAP (PAX-5), PAX-2 and PAX-8. *EMBO J.*, 1996, vol. 15 (8), 1971-1982 [0398]
- Dressler et al. *Development*, 1990, vol. 109, 787-795 [0398]
- Dressler GR ; Douglass EC. Pax-2 is a DNA-binding protein expressed in embryonic kidney and Wilms tumor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, vol. 89 (4), 1179-1183 [0398]
- Dressler GR ; Woolf AS. PAX2 in development and renal disease. *Int J Dev Biol*, 1999, vol. 43 (5), 463-468 [0398]
- Dressler GR. Pax-2, kidney development, and oncogenesis. *Med Pediatr Oncol*, 1996, vol. 27 (5), 440-444 [0398]
- Dunn GP ; Bruce AT ; Ikeda H ; Old LJ ; Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, 2002, vol. 3, 991-998 [0398]
- Eccles MR ; He S ; Legge M ; Kumar R ; Fox J ; Zhou C ; French M ; Tsai RW. PAX genes in development and disease: the role of PAX2 in urogenital tract development. *Int J Dev Biol*, 2002, vol. 46 (4), 535-544 [0398]
- Eccles MR ; Wallis LJ ; Fidler AE ; Spurr NK ; Goodfellow PJ ; Reeve AE. Expression of the PAX2 gene in human fetal kidney and Wilms' tumor. *Cell Growth Differ*, 1992, vol. 3 (5), 279-289 [0398]
- Eccles, M.R. ; HE, S. ; Legge, M. ; Kumar, R. ; Fox, J. ; Zhou, C. ; French, M. ; Tsai, R.W. PAX genes in development and disease: the role of PAX2 in urogenital tract development. *Int. J. Dev. Biol.*, 2002, vol. 46 (4), 535-544 [0398]
- Ganz, T. Defensins and host defense. *Science*, 1999, vol. 286, 420-421 [0398]
- Ganz, T. Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *CR Biol.*, 2004, vol. 327, 539-549 [0398]
- Eccles et al. PAX genes in development and disease: the role of PAX2 in urogenital tract development. *Int. J. Dev. Biol.*, 2002, vol. 46 (4), 535-544 [0398]
- Fong, L. ; Brockstedt, D. ; Benike, C. ; Breen, J. K. ; Strang, G. ; Ruegg, C. L. ; Engleman, E. G. Dendritic Cell-Based Xenoantigen Vaccination for Prostate Cancer Immunotherapy. *J Immunol*, 2001, vol. 167 (12), 7150-7156 [0398]
- Fonsato V. et al. Expression of Pax2 in human renal tumor-derived endothelial cells sustains apoptosis resistance and angiogenesis. *Am J Pathol*, February 2006, vol. 168 (2), 706-1 [0398]
- Fromont, G. ; Joulin, V. ; Chantrel-Groussard, K. ; Vallancien, G. ; Guillonneau, B. ; Validire, P. ; Latil, A. ; Cussenot, O. Allelic losses in localized prostate cancer: association with prognostic factors. *J Urol*, 2003, vol. 170, 1394-7 [0398]
- Fujii Y ; Kageyama Y ; Kawakami S ; Kihara K ; Oshima H. Detection of disseminated urothelial cancer cells in peripheral venous blood by a cytokeratin 20-specific nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Jpn J Cancer Res*, 1999, vol. 90, 753-757 [0398]
- Gann et al. *JAMA*, 1995, vol. 273, 289-294 [0398]
- Ganz T ; Weiss J. Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia. *Semin Hematol*, October 1997, vol. 34 (4), 343-54 [0398]
- Ganz, T. Defensins and host defense. *Science*, 1999, vol. 286 (5439), 420-1 [0398]
- Ganz, T. Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *CR Biol*, 2004, vol. 327 (6), 539-49 [0398]
- Ganz, T. Immunology. Versatile defensins. *Science*, 2002, vol. 298 (5595), 977-9 [0398]
- Gerhard M ; Juhl H ; Kalthoff H ; Schreiber HW ; Wagener C ; Neumaier M. Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *J Clin Oncol*, 1994, vol. 12, 725-729 [0398]
- Ghossein RA ; Bhattacharya S ; Rosai J. Molecular detection of micrometastases and circulating tumor cells in solid tumors. *Clin Cancer Res*, 1999, vol. 5, 1950-1960 [0398]
- Ghossein RA ; Scher HI ; Gerald WL ; Kelly WK ; Curley T ; Amsterdam A ; Zhang ZF ; Rosai J. Detection of circulating tumor cells in patients with localized and metastatic prostatic carcinoma: clinical implications. *J Clin Oncol*, 1995, vol. 13, 1195-1200 [0398]
- Gibson, W. ; Green, A. ; Bullard, R.S. ; Eaddy, A.R. ; Donald, C.D. Inhibition of PAX2 expression results in alternate cell death pathways in prostate cancer cells differing in p53 status. *Cancer Lett.*, 2007, vol. 248 (2), 251-261 [0398]

- Gilbey AM ; Burnett D ; Coleman RE ; Holen I. The detection of circulating breast cancer cells in blood. *J Clin Pathol*, 2004, vol. 57, 903-911 [0398]
- 5 • Gleason. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep*, 1966, vol. 50, 125-128 [0398]
- 10 • Gnarra, J. R. ; Dressler, G. R. Expression of Pax-2 in human renal cell carcinoma and growth inhibition by antisense oligonucleotides. *Cancer Res*, 1995, vol. 55 (18), 4092-8 [0398]
- 15 • Goldman MJ ; Anderson GM ; Stolzenberg ED ; Kari UP ; Zasloff M ; Wilson JM. Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell*, 21 February 1997, vol. 88 (4), 553-60 [0398]
- 20 • Groppe, R. ; Frye, M. ; Wagner, T. O. ; Bargon, J. Epithelial defensins impair adenoviral infection: implication for adenovirus-mediated gene therapy. *Hum Gene Ther*, 1999, vol. 10 (6), 957-64 [0398]
- 25 • Gunther, M. ; Wagner, E. ; Ogris, M. Specific targets in tumor tissue for the delivery of therapeutic genes. *Curr Med Chem Anti-Canc Agents*, 2005, vol. 5 (2), 157-71 [0398]
- 30 • Guseva, N.V. et al. Death receptor-induced cell death in prostate cancer. *J. Cell Biochem.*, 2004, vol. 91, 70-99 [0398]
- 35 • Harder J ; Bartels J ; Christophers E ; Schroder JM. A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, 26 June 1997, vol. 387 (6636), 861 [0398]
- 40 • Harder J ; Bartels J ; Christophers E ; Schroder JM. Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *Biol Chem.*, 23 February 2001, vol. 276 (8), 5707-13 [0398]
- 45 • Harder J ; Siebert R ; Zhang Y ; Matthiesen P ; Christophers E ; Schlegelberger B ; Schroder JM. Mapping of the gene encoding human beta-defensin-2 (DEFB2) to chromosome region 8p22-p23.1. *Genomics*, 15 December 1997, vol. 46 (3), 472-5 [0398]
- 50 • Havik B ; Ragnhildstveit E ; Lorens JB ; Saelemyr K ; Fauske O ; Knudsen LK ; Fjose A. A novel paired domain DNA recognition motif can mediate PAX2 repression of gene transcription. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, vol. 266 (2), 532-541 [0398]
- 55 • Hildebrandt M ; Mapara MY ; Korner IJ ; Bargou RC ; Moldenhauer G ; Dorken B. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)-controlled immunomagnetic purging of breast cancer cells using the magnetic cell separation (MACS) system: a sensitive method for monitoring purging efficiency. *Exp Hematol*, 1997, vol. 25, 57-65 [0398]
- 60 • Hoon DS ; Sarantou T ; Doi F ; Chi DD ; Kuo C ; Conrad AJ ; Schmid P ; Turner R ; Giuliano A. Detection of metastatic breast cancer by b-hCG polymerase chain reaction. *Int J Cancer*, 1996, vol. 69, 369-374 [0398]
- 65 • Hueber et al. PAX2 inactivation enhances cisplatin-induced apoptosis in renal carcinoma cells. *Kidney Int.*, April 2006, vol. 69 (7), 1139-45 [0398]
- Hugel, A. ; Wernert, N. Loss of heterozygosity (LOH), malignancy grade and clonality in microdissected prostate cancer. *Br J Cancer*, 1999, vol. 79 (3-4), 551-7 [0398]
- Ino K ; Shibata K ; Kajiyama H ; Yamamoto E ; Nagasaka T ; Nawa A ; Nomura S ; Kikkawa F. Angiotensin II type 1 receptor expression in ovarian cancer and its correlation with tumor angiogenesis and patient survival. *Br J Cancer*, 2006, vol. 94 (4), 552-560 [0398]
- Isaacs, W.B. et al. Wild-type p53 suppresses growth of human prostate cancer cells containing mutant p53 alleles. *Cancer Res*, 1991, vol. 51, 4716-4720 [0398]
- Jackers, P. ; Szalai, G. ; Watson, D. K. Ets-dependent regulation of target gene expression during megakaryopoiesis. *preparation*, 2003 [0398]
- Jemal, A. ; Siegel, R. ; Ward, E. ; Murray, T. ; Xu, J. ; Smigal, C. ; Thun, M.J. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J. Clin.*, 2006, vol. 56, 106-130 [0398]
- Jemal, A. ; Tiwari, R. C. ; Murray, T. ; Ghafoor, A. ; Samuels, A. ; Ward, E. ; Feuer, E. J. ; Thun, M. J. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin*, 2004, vol. 54 (1), 8-29 [0398]
- Jia HP ; Schutte BC ; Schudy A ; Linzmeier R ; Guthmiller JM ; Johnson GK ; Tack BF ; Mitros JP ; Rosenthal A ; Ganz T. Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene*, 24 January 2001, vol. 263 (1-2), 211-8 [0398]
- Jia HP ; Wowk SA ; Schutte BC ; Lee SK ; Vivado A ; Tack BF ; Bevins CL ; McCray PB Jr. A novel murine beta-defensin expressed in tongue, esophagus, and trachea. *J Biol Chem*, 27 October 2000, vol. 275 (43), 33814-20 [0398]
- Johnson PW ; Burchill SA ; Selby PJ. The molecular detection of circulating tumor cells. *Br J Cancer*, 1995, vol. 72, 268-276 [0398]
- Jotsuka T ; Okumura Y ; Nakano S ; Nitta H ; Sato T ; Miyachi M ; Suzumura K ; Yamashita J. Persistent evidence of circulating tumor cells detected by means of RT-PCR for CEA mRNA predicts early relapse: a prospective study in node-negative breast cancer. *Surgery*, 2004, vol. 135, 419-426 [0398]
- Juin, P. ; Hunt, A. ; Littlewood, T. ; Griffiths, B. ; Brown-Swigart, L. ; Korsmeyer, S. ; Evan, G. c-Myc functionally cooperates with Bax to induce apoptosis. *Mol. Cell Biol.*, 2002, vol. 22, 6158-6169 [0398]
- Jung, J. E. ; Lee, J. ; Ha, J. ; Kim, S. S. ; Cho, Y. H. ; Baik, H. H. ; Kang, I. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-ribonucleoside enhances oxidative stress-induced apoptosis through activation of nuclear factor- κ B in mouse Neuro 2a neuroblastoma cells. *Neurosci. Lett.*, 2004, vol. 354, 197-200 [0398]

- Jurevic, R.J. ; Chrisman, P. ; Mancl, L. ; Livingston, R. ; Dale, B.A. Single-nucleotide polymorphisms and haplotype analysis in beta-defensin genes in different ethnic populations. *Genet. Test.*, 2002, vol. 6 (26), 1-269 [0398]
- Kasahara, K. et al. Detection of genetic alterations in advanced prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 2002, vol. 137 (1), 59-63 [0398]
- Kefas, B. A. ; Cai, Y. ; Ling, Z. ; Heimberg, H. ; Hue, L. ; Pipeleers, D. ; Van de Castele, M. AMP-activated protein kinase can induce apoptosis of insulin-producing MIN6 cells through stimulation of c-Jun-N-terminal kinase. *J. Mol. Endocrinol.*, 2003, vol. 30, 151-161 [0398]
- Kelloff, G.J. ; Lippman, S.M. ; Dannenberg, A.J. et al. Progress in chemoprevention drug development: the promise of molecular biomarkers for prevention of intraepithelial neoplasia and cancer--a plan to move forward. *Clin Cancer Res.*, 15 June 2006, vol. 12 (12), 3661-97 [0398]
- Khoubahi B ; Kessling AM ; Adshead JM ; Smith GL ; Smith RD ; Ogden CW. Expression of the developmental and oncogenic PAX2 gene in human prostate cancer. *J Urol.*, 2001, vol. 165, 2115-2120 [0398]
- Krisanaprakornkit S ; Weinberg A ; Perez CN ; Dale BA. Expression of the peptide antibiotic human beta-defensin 1 in cultured gingival epithelial cells and gingival tissue. *Infect Immun.*, September 1998, vol. 66 (9), 4222-8 [0398]
- Lang D ; Powell SK ; Plummer RS ; Young KP ; Ruggeri BA. PAX genes: Roles in development, pathophysiology, and cancer. *Biochem Pharmacol.*, 2006 [0398]
- Lehrer, R.I. ; Ganz, T. Endogenous vertebrate antibiotics. Defensins, protegrins, and other cysteine-rich antimicrobial peptides. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1996, vol. 797, 228-239 [0398]
- Li, J. ; Jiang, P. ; Robinson, M. ; Lawrence, T. S. ; Sun, Y. AMPK- β 1 subunit is a p53-independent stress responsive protein that inhibits tumor cell growth upon forced expression. *Carcinogenesis*, 2003, vol. 24, 827-834 [0398]
- Lin, S. ; Ying, S. Y. Differentially expressed genes in activin-induced apoptotic LNCaP cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, vol. 257 (1), 187-92 [0398]
- Linzmeier, R. ; Ho, C. H. ; Hoang, B. V. ; Ganz, T. A 450-kb contig of defensin genes on human chromosome 8p23. *Gene*, 1999, vol. 233 (1-2), 205-11 [0398]
- Liu, J. ; Wilson, T. E. ; Milbrandt, J. ; Johnsen, M. Identifying DNA-binding sites and analyzing DNA-binding domains using a yeast selection system. *METHODS: A companion to Methods in Enzymology*, 1993, vol. 5, 125-137 [0398]
- Discenza MT ; He S ; Lee TH ; Chu LL ; Bolon B ; Goodyer P ; Eccles M ; Pelletier J. WT1 is a modifier of the Pax2 mutant phenotype: cooperation and interaction between WT1 and Pax2. *Oncogene*, 2003, vol. 22 (50), 8145-8155 [0398]
- Macoska, J. A. ; Paris, P. ; Collins, C. ; Andaya, A. ; Beheshti, B. ; Chaib, H. ; Kant, R. ; Begley, L. ; MacDonald, J. W. ; Squire, J. A. Evolution of 8p loss in transformed human prostate epithelial cells. *Cancer Genet Cytogenet*, 2004, vol. 154 (1), 36-43 [0398]
- Mansouri, A. et al. Pax genes and their roles in cell differentiation and development. *Cur. Opin. Cell Biol.*, 1996, vol. 8, 851-857 [0398]
- Margue, C. M. ; Bernasconi, M. ; Barr, F. G. ; Schafer, B. W. Transcriptional modulation of the anti-apoptotic protein BCL-XL by the paired box transcription factors PAX3 and PAX3/FKHR. *Oncogene*, 2000, vol. 19 (25), 2921-9 [0398]
- Margue, C.M. et al. Transcriptional modulation of the anti-apoptotic protein BCL-XL by the paired box transcription factors PAX3 and PAX3/FKHR. *Oncogene*, 2003, vol. 19 (25), 2921-2929 [0398]
- Margue, C.M. et al. Transcriptional modulation of the anti-apoptotic protein BCL-XL by the paired box transcription factors PAX3 and PAX3/FKHR. *Oncogene*, 2000, vol. 19, 2921-2929 [0398]
- Mathews M ; Jia HP ; Guthmiller JM ; Losh G ; Graham S ; Johnson GK ; Tack BF ; McCray PB Jr. Production of beta-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivary glands. *Infect Immun.*, June 1999, vol. 67 (6), 2740-5 [0398]
- Matsumura M ; Niwa Y ; Kato N ; Komatsu Y ; Shiina S ; Kawabe T ; Kawase T ; Toyoshima H ; Ihori M ; Shiratori Y. Detection of a-fetoprotein mRNA, an indicator of hematogenous spreading hepatocellular carcinoma, in the circulation: a possible predictor of metastatic hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 1994, vol. 20, 1418-1425 [0398]
- Maulbecker C C ; Gruss P. The oncogenetic potential of Pax genes. *Embo J.*, 1993, vol. 12 (6), 2361-7 [0398]
- Mazal, P. R. ; Stichenwirth, M. ; Koller, A. ; Blach, S. ; Haitel, A. ; Susani, M. Expression of aquaporins and PAX-2 compared to CD10 and cytokeratin 7 in renal neoplasms: a tissue microarray study. *Mod Pathol*, 2005, vol. 18 (4), 535-40 [0398]
- Mazzucchelli, R. ; Barbisan, F. ; Tarquini, L. M. ; Galosi, A. B. ; Stramazzotti, D. Molecular mechanisms in prostate cancer. A review. *Anal Quant Cytol Histol*, 2004, vol. 26 (3), 127-33 [0398]
- McConnell, M. J. ; Cunliffe, H. E. ; Chua, L. J. ; Ward, T. A. ; Eccles, M. R. Differential regulation of the human Wilms tumor suppressor gene (WT1) promoter by two isoforms of PAX2. *Oncogene*, 1997, vol. 14 (22), 2689-700 [0398]

- McCray PB Jr ; Bentley L. Human airway epithelia express a beta-defensin. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, March 1997, vol. 16 (3), 343-9 [0398]
- 5 • McNamara NA ; Van R ; Tuchin OS ; Fleiszig SM. Lar surface epithelia express mRNA for human beta defensin-2Exp. *Eye Res.*, November 1999, vol. 69 (5), 483-90 [0398]
- 10 • McNeel, D.G. ; Malkovsky, M. Immune-based therapies for prostate cancer. *Immunol. Lett.*, 2005, vol. 96, 3-9 [0398]
- 15 • Meisse, D. ; Van de Castele, M. ; Beauloye, C. ; Hainault, I. ; Kefas, B. A. ; Rider, M. H. ; Foufelle, F. ; Hue, L. Sustained activation of AMP-activated protein kinase induces c-Jun N-terminal kinase activation and apoptosis in liver cells. *FEBS Lett.*, 2002, vol. 526, 38-42 [0398]
- 20 • Michalak, E. ; Villunger, A. ; Erlacher, M. ; Strasser, A. Death squads enlisted by the tumor suppressor p53. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, vol. 331 (3), 786-98 [0398]
- 25 • Muratovska A ; Zhou C ; He S ; Goodyer P ; Eccles MR. Paired-Box genes are frequently expressed in cancer and often required for cancer cell survival. *Oncogene*, 2003, vol. 22 (39), 7989-7997 [0398]
- 30 • Murer, L. ; Caridi, G. ; Della Vella, M. ; Montini, G. ; Carasi, C. ; Ghiggeri, G. ; Zacchello, G. Expression of nuclear transcription factor PAX2 in renal biopsies of juvenile nephronophthisis. *Nephron*, 2002, vol. 91 (4), 588-93 [0398]
- 35 • Nakamura, Y. Isolation of p53-target genes and their functional analysis. *Cancer Sci.*, 2004, vol. 95 (1), 7-11 [0398]
- 40 • Nelson, W.G. ; De Marzo, A.M. ; DeWeese, T.L. ; Isaacs, W.B. The role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer. *J. Urol.*, 2004, vol. 172, S6-S11S11-S12 [0398]
- 45 • Nigro, J. M. ; Sikorski, R. ; Reed, S. I. ; Vogelstein, B. Human p53 and CDC2Hs genes combine to inhibit the proliferation of Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol*, 1992, vol. 12, 1357-1365 [0398]
- 50 • Nishimura, M. ; Abiko, Y. ; Kurashige, Y. ; Takeshima, M. ; Yamazaki, M. ; Kusano, K. ; Saitoh, M. ; Nakashima, K. ; Inoue, T. ; Kaku, T. Effect of defensin peptides on eukaryotic cells: primary epithelial cells, fibroblasts and squamous cell carcinoma cell lines. *Journal of Dermatological Science*, 2004, vol. 36 (2), 87 [0398]
- 55 • Noguchi S ; Aihara T ; Motomura K ; Inaji H ; Imamura S ; Koyama H. Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Comparison between MUC1 mRNA and keratin 19 mRNA amplification. *Am J Pathol*, 1996, vol. 148, 649-656 [0398]
- 60 • O'Hara SM ; Moreno JG ; Zweitzig DR ; Gross S ; Gomella LG ; Terstappen LW. Multigene reverse transcription-PCR profiling of circulating tumor cells in hormone-refractory prostate cancer. *Clin Chem*, 2004, vol. 50, 826-835 [0398]
- Ogata, T. ; Muroya, K. ; Sasagawa, I. ; Kosho, T. ; Wakui, K. ; Sakazume, S. ; Ito, K. ; Matsuo, N. ; Ohashi, H. ; Nagai, T. Genetic evidence for a novel gene(s) involved in urogenital development on 10q26. *Kidney Int*, 2000, vol. 58 (6), 2281-90 [0398]
- O'Neil DA ; Porter EM ; Elewaut D ; Anderson GM ; Eckmann L ; Ganz T ; Kagnoff MF. Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol.*, 15 December 1999, vol. 163 (12), 6718-24 [0398]
- Orlando, V. Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem Sci*, 2000, vol. 25, 99-104 [0398]
- Ostrom, L. ; Tang, M. J. ; Gruss, P. ; Dressler, G. R. Reduced PAX2 gene dosage increases apoptosis and slows the progression of renal cystic disease. *Dev Biol*, 2000, vol. 219 (2), 250-8 [0398]
- Palapattu, G.S. ; Sutcliffe, S. ; Bastian, P.J. ; Platz, E.A. ; De Marzo, A.M. ; Isaacs, W.B. ; Nelson, W.G. Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights. *Carcinogenesis*, 2005, vol. 26, 1170-1181 [0398]
- Pantel K ; Riethmuller G. Micrometastasis detection and treatment with monoclonal antibodies. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1996, vol. 213, 1-18 [0398]
- Papo, N. ; Shai, Y. Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. *Cell Mol. Life Sci.*, 2005, vol. 62, 784-790 [0398]
- Perfettini, J.L. ; Kroemer, R. T. ; Kroemer, G. Fatal liaisons of p53 with Bax and Bak. *Nat Cell Biol*, 2004, vol. 6 (5), 386-8 [0398]
- Perfettini, J. L. ; Roumier, T. ; Kroemer, G. Mitochondrial fusion and fission in the control of apoptosis. *Trends Cell Biol*, 2005, vol. 15 (4), 179-83 [0398]
- Perfettini, J.L. et al. Fatal liaisons of p53 with Bax and Bak. *Nat. Cell Biol.*, 2004, vol. 6 (5), 386-388 [0398]
- Perfettini, J.L. et al. Mitochondrial fusion and fission in the control of apoptosis. *Trends Cell Biol.*, 2005, vol. 15 (4), 179-183 [0398]
- Prasad, M.A. ; Trybus, T.M. ; Wojno, K.J. ; Macoska, J.A. Homozygous and frequent deletion of proximal 8p sequences in human prostate cancers: identification of a potential tumor suppressor gene site. *Genes Chromosomes Cancer*, 1998, vol. 23, 255-262 [0398]
- Raj GV ; Moreno JG ; Gomella LG. Utilization of polymerase chain reaction technology in the detection of solid tumors. *Cancer*, 1998, vol. 82, 1419-1442 [0398]

- **Reiger, K.M. et al.** Human bladder carcinoma lines as indicators of oncogenic change relevant to urothelial neoplastic progression. *Br. J. Cancer*, 1995, vol. 72 (3), 683-690 [0398]
- 5 • **Robson, E.J. et al.** PANorama of PAX genes in cancer and development. *Nat. Rev. Cancer*, 2006, vol. 6 (1), 52-62 [0398]
- 10 • **Saitoh, M. ; Nagai, K. ; Nakagawa, K. ; Yamamura, T. ; Yamamoto, S. ; Nishizaki, T.** Adenosine induces apoptosis in the human gastric cancer cells via an intrinsic pathway relevant to activation of AMP-activated protein kinase. *Biochem. Pharmacol.*, 2004, vol. 67, 2005-2411 [0398]
- 15 • **Sanyanusin P et al.** Genomic structure of the PAX2 gene. *Genomics*, 1996, vol. 35 (1), 258-261 [0398]
- 20 • **Schmidt B ; Anastasiadis AG ; Seifert HH ; Franke KH ; Oya M ; Ackermann R.** Detection of circulating prostate cells during radical prostatectomy by standardized PSMA RT-PCR: association with positive lymph nodes and high malignant grade. *Anticancer Res*, 2003, vol. 23, 3991-3999 [0398]
- 25 • **Seiden MV ; Kantoff PW ; Krishivas K ; Propert K ; Bryant M ; Haltom E ; aynes L ; Kaplan I ; Bubley G ; DeWolf W.** Detection of circulating tumor cells in men with localized prostate cancer. *J Clin Oncol*, 1994, vol. 12, 2634-2639 [0398]
- 30 • **Shariat SF ; Kattan MW ; Song W ; Bernard D ; Gottenger E ; Wheeler TM ; Slawin KM.** Early post-operative peripheral blood reverse transcription PCR assay for prostate-specific antigen is associated with prostate cancer progression in patients undergoing radical prostatectomy. *Cancer Res*, 2003, vol. 63, 5874-5878 [0398]
- 35 • **Sherman, H. ; Chapnik, N. ; Froy, O.** Albumin and amino acids upregulate the expression of human beta-defensin 1. *Mol. Immunol.*, 2006, vol. 43, 1617-1623 [0398]
- 40 • **Sikorski, R. S. ; Hieter, P.** A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 1989, vol. 122, 19-27 [0398]
- 45 • **Soeth E ; Vogel I ; Roder C ; Juhl H ; Marxsen J ; Kruger U ; Henne-Bruns D ; Kremer B ; Kalthoff H.** Comparative analysis of bone marrow and venous blood isolates from gastrointestinal cancer patients for the detection of disseminated tumor cells using reverse transcription PCR. *Cancer Res*, 1997, vol. 57, 3106-3110 [0398]
- 50 • **Stambolic, V. et al.** Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*, October 1998, vol. 295 (1), 29-39 [0398]
- 55 • **Strasser, A.** The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005, vol. 5 (3), 189-200 [0398]
- 60 • **Stuart E T et al.** Mammalian Pax genes. *Annual Review of Genetics*, 1994, vol. 28 (219), 219-36 [0398]
- 65 • **Stuart E T et al.** PAX and HOX in neoplasia. *Advances in Genetics*, 1995, vol. 33 (255), 255-74 [0398]
- **Stuart ET ; Haffner R ; Oren M ; Gruss P.** Loss of p53 function through PAX-mediated transcriptional repression. *Embo J*, 1995, vol. 14 (22), 5638-5645 [0398]
- **Tagge, E. P. ; Hanson, P. ; Re, G. G. ; Othersen, H. B., Jr. ; Smith, C. D. ; Garvin, A. J.** Paired box gene expression in Wilms' tumor. *J Pediatr Surg*, 1994, vol. 29 (2), 134-41 [0398]
- **Takeuchi, S. ; Iida, M. ; Kobayashi, S. ; Jin, K. ; Matsuda, T. ; Kojima, H.** Differential effects of phthalate esters on transcriptional activities via human estrogen receptors alpha and beta, and androgen receptor. *Toxicology*, 2005, vol. 210 (2-3), 223-33 [0398]
- **Teixeira, M. R. ; Ribeiro, F. R. ; Eknaes, M. ; Wae-hre, H. ; Stenwig, A. E. ; Giercksky, K. E. ; Heim, S. ; Lothe, R. A.** Genomic analysis of prostate carcinoma specimens obtained via ultrasound-guided needle biopsy may be of use in preoperative decision-making. *Cancer*, 2004, vol. 101 (8), 1786-93 [0398]
- **Tepper, C.G. et al.** Profiling of gene expression changes caused by p53 gain-of-function mutant alleles in prostate cancer cells. *Prostate*, 2005, vol. 65 (4), 375-389 [0398]
- **Tien, A.H. ; Xu, L. ; Helgason, C.D.** Altered immunity accompanies disease progression in a mouse model of prostate dysplasia. *Cancer Res.*, 2005, vol. 65, 2947-2955 [0398]
- **Tokino, T. ; Nakamura, Y.** The role of p53-target genes in human cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2000, vol. 33 (1), 1-6 [0398]
- **Torres, M. et al.** PAX-2 controls multiple steps of urogenital development. *Development*, 1995, vol. 121, 4057-4065 [0398]
- **Uemura H ; Hasumi H ; Ishiguro H ; Teranishi J ; Miyoshi Y ; Kubota Y.** Renin-angiotensin system is an important factor in hormone refractory prostate cancer. *Prostate*, 2006, vol. 66 (8), 822-830 [0398]
- **Uemura H ; Ishiguro H ; Kubota Y.** Angiotensin II receptor blocker: possibility of antitumor agent for prostate cancer. *Mini Rev Med Chem*, 2006, vol. 6 (7), 835-844 [0398]
- **Valore EV ; Park CH ; Quayle AJ ; Wiles KR ; McCray PB Jr ; Ganz T.** Human beta-defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest.*, 15 April 1998, vol. 101 (8), 1633-42 [0398]
- **Vecchione, A. ; Ishii, H. ; Baldassarre, G. ; Bassi, P. ; Trapasso, F. ; Alder, H. ; Pagano, F. ; Gomella, L. G. ; Croce, C. M. ; Baffa, R.** FEZ1/LZTS1 is down-regulated in high-grade bladder cancer, and its restoration suppresses tumorigenicity in transitional cell carcinoma cells. *Am J Pathol*, 2002, vol. 160 (4), 1345-52 [0398]
- **Vogelstein, B. et al.** The multi-step nature of cancer. *Trends Genet.*, 1993, vol. 9 (4), 138-141 [0398]

- **Wallin, J.J. et al.** Dependence of BSAP repressor and activator functions on BSAP concentration. *Science*, 1998, vol. 279, 1961-1964 [0398]
- 5 • **Wang ZP ; Eisenberger MA ; Carducci MA ; Partin AW ; Scher HI ; Ts'o PO.** Identification and characterization of circulating prostate carcinoma cells. *Cancer*, 2000, vol. 88, 2787-2795 [0398]
- 10 • **Wang, Z. ; Lai, F. M.** Analysis of loss of heterozygosity on chromosome 8 in human prostate carcinoma and high grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 2004, vol. 10 (1), 26-8 [0398]
- 15 • **Wells, J. ; Farnham, P. J.** Characterizing transcription factor binding sites using formaldehyde crosslinking and immunoprecipitation. *Methods*, 2002, vol. 26, 48-56 [0398]
- 20 • **Wilson, T. E. ; Fahrner, T. J. ; Johnston, M. ; Milbrandt, J.** Identification of the DNA binding site for NGFI-B by genetic selection in yeast. *Science*, 1991, vol. 252, 1296-1300 [0398]
- 25 • **Xiang, X. ; Saha, A. K. ; Wen, R. ; Ruderman, N. B. ; Luo, Z.** AMP-activated protein kinase activators can inhibit the growth of prostate cancer cells by multiple mechanisms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, vol. 321, 161-167 [0398]
- **Xu ; Rould ; Jun ; Desplan ; Pabo.** *Cell*, 1995, vol. 80, 639-650 [0398]
- **Yang, D. ; Biragyn, A. ; Hoover, D. M. ; Lubkowski, J. ; Oppenheim, J. J.** Multiple Roles of Antimicrobial Defensins, Cathelicidins, and Eosinophil-Derived Neurotoxin in Host Defense. *Annual Review of Immunology*, 2004, vol. 22 (1), 181-215 [0398]
- **Ylikoski A ; Pettersson K ; Nurmi J ; Irljala K ; Karp M ; Lilja H ; Lovgren T ; Nurmi M.** Simultaneous quantification of prostate-specific antigen and human glandular kallikrein 2 mRNA in bloodsamples from patients with prostate cancer and benign disease. *Clin Chem*, 2002, vol. 48, 1265-1271 [0398]
- **Yuan SS ; Yeh YT ; Lee EY.** Pax-2 interacts with RB and reverses its repression on the promoter of Rig-1, a Robo member. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, vol. 296 (4), 1019-1025 [0398]
- **Zucht HD ; Grabowsky J ; Schrader M ; Liepke C ; Jurgens M ; Schulz-Knappe P ; Forssmann WG.** Human beta-defensin-1: A urinary peptide present in variant molecular forms and its putative functional implication. *Eur J Med Res.*, 20 July 1998, vol. 3 (7), 315-23 [0398]

30