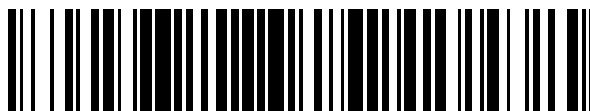


19



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**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**06.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**06.11.2012**

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

72 Inventor/es:  
**DONALD, CARLTON, D.**

74 Agente/Representante:  
**ZEA CHECA, Bernabé**

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

ES 2 390 083 T3

## 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 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 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.

[0003] La quimioprevención del cáncer se define como la prevención de cáncer o tratamiento en el estado pre-canceroso 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 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

[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 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.

### 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 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 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 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.

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  $\pm$  d. t., n=9.

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)<sup>-</sup> anexina V<sup>+</sup> (cuadrante derecho inferior) y células PI<sup>+</sup> anexina V<sup>+</sup> (cuadrante derecho superior). Los datos son de un único experimento que es representativo de tres experimentos separados.

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).

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  $\beta$ -actina como un control interno.

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.

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  $\mu$ g 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  $\pm$  d.t., n=9.

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).

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

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  $\mu$ M de AngII durante 72 horas dio como resultado un aumento de 2 veces en la expresión de PAX2. Además, el tratamiento con 10  $\mu$ M durante 72 horas dio como resultado más de un aumento de 3 veces en la expresión. El tratamiento de células con 5  $\mu$ 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.

La Figura 22 muestra que AngII aumenta la proliferación de células DU145. El tratamiento de células DU145 con 5  $\mu$ M de AngII durante 72 horas dio como resultado un aumento de 2 veces en la proliferación. Además, el tratamiento con 10  $\mu$ M durante 72 horas dio como resultado más de un aumento de 3 veces en la proliferación.

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.



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.

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.

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.

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.

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.

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 N° 1457 con cáncer con puntuación de Gleason 6 tenía más DEFB1 en tejido normal y PIN y en comparación con el paciente N° 1569 con cáncer con puntuación de Gleason 7. Por el contrario, el paciente N° 1569 tenía mayores niveles de PAX2 en regiones cancerosas en comparación con el paciente N° 1457.

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-canceroso) 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).

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.

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 transfectaron con hBD-1 y se indujeron durante 18 h (c: DIC y d: fluorescencia). Barra de tamaño: 20  $\mu$ M.

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  $\pm$  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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\mu$ m.

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  $\pm$  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  $\mu$ m.

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  $\pm$  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.

[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 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 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 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), DEFB 2 (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 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 C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub> y C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. 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 C<sub>5</sub> y C<sub>6</sub>, localizado 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 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.

**[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 parece que son 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 tricaténaria, 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.

**[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

**[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.

**[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.

**[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.

**[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 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.

**[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 tumorigénesis. Por lo tanto, pueden usarse muestras de pacientes recogidas para explorar la presencia de proteínas o antígenos PAX2 para la detección precoz del cáncer.

**[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 quimioprevención 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 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 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.

**[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.

**[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.

**[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 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.

**[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.

**[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 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, 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 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 retropúbica 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.

20

**[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 (cistoscopia) se coloca en el pene y el bloqueo de la próstata se secciona.

25

**[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.

30

**[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,

35

**[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 radioterapia.

40

**[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.

45

**[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 haz externo, braquiterapia y terapia hormonal.

50

**[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

55

60

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 hipófisis, 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 hipófisis 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 descienden. 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 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.  
15

**[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.  
20

**[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 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.  
25 30

**[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, ubiquitinación. 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 impedir la unión de la quinasa a su sustrato.  
35 40

**[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 al sujeto se le puede diagnosticar en primer lugar una afección pre-cancerosa (por ejemplo PIN) o cáncer.  
45

**[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) 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 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.  
50 55

**[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  $\mu$ M y 50  $\mu$ M, 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-canceroso (por ejemplo, PIN) o cáncer.

**[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 AUAGACUCGACUUGACUUCUU (SEC ID N°:2),  
AUCUUAUCACGUUCCUCUU (SEC ID N°:4),  
20 GUAUUCAGCAAUCUUGUCCUU (SEC ID N°:6),  
GAUUUGAUGUGCUCUGAUGUU (SEC ID N°: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:

N°1 ACCCGACTATGTTTCGCTGG (SEC ID N°:56),  
N°2 AAGCTCTGGATCGAGTCTTTG (SEC ID N°:57),  
30 y N° 4 ATGTGTCAGGCACACAGACG (SEC ID N°:58). Se observó que el N°4 inhibía PAX2 X2 (Davies *et al.*, Hum. Mol. Gen Jan. 15, 13 (2); 235).

**[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 N°:59) y GGAUGCAGAUAGACUCGACTT (SEC ID N°:60).

**[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.

**[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).

65

**[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 interactuar 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 "homeodominio". 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  $\alpha 3$  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 N°:1). Los oligonucleótidos hasta y sobrepasando 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 N°:1 (CCTTG).

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

**[0085]**  $X_1$ -CCTTG (SEC ID N°:1)- $X_2$ , en la que  $X_1$  es de 1 a 35 nucleótidos flanqueantes contiguos de DEFB1 y  $X_2$  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:

CTCCCTTCAGTTCGTCGAC (SEC ID N°:9)

CTCCCTTCACCTTGGTCGAC (SEC ID N°:10)

ACTGTGGCACCTCCCTTCAGTTCGTCGACGAGGTTGTGC (SEC ID N°:12)

ACTGTGGCACCTCCCTTCACCTTGGTCGACGAGGTTGTGC (SEC ID N°: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 hipóxicos, 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 30 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 35 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 40 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 45 (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 50 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 55 un par de unión, tal como biotina/estreptavidina, un metal (por ejemplo, oro) o una etiqueta epitópica 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 60 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 65 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-Metilumbeliferona; 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-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<sup>TM</sup>; Alexa Fluor 430<sup>TM</sup>; Alexa Fluor 488<sup>TM</sup>; Alexa Fluor 532<sup>TM</sup>; Alexa Fluor 546<sup>TM</sup>; Alexa Fluor 568<sup>TM</sup>; Alexa Fluor 594<sup>TM</sup>; Alexa Fluor 633<sup>TM</sup>; Alexa Fluor 647<sup>TM</sup>; Alexa Fluor 660<sup>TM</sup>; Alexa Fluor 680<sup>TM</sup>; Alizarin Complexon; Rojo de Alizarina; Aloficocianina (APC); AMC, AMCA-S; Aminometilcoumarina (AMCA); AMCA-X; Aminoactinomicina D; Aminocoumarina; Azul de Anilina; Antrociol Estearato; APC-Cy7; APTRA-BTC; APTS; Rojo Brillante Astrazon 4G; Naranja Astrazon R; Rojo Astrazon

15 6B; GLL Amarillo Astrazon 7; Atabrina; ATTO- TAG<sup>TM</sup> CBQCA; ATTO-TAG<sup>TM</sup> FQ; Auramina; Aurofosfina G; Aurofosfina; 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; Bisbenzimidaz; Bisbenzimidaz (Hoechst); bis- BTC; Blancofor FFG; Blancofor SV; BOBO<sup>TM</sup> -1; BOBO<sup>TM</sup> -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<sup>TM</sup> -1; BO-PRO<sup>TM</sup> -3; Sulfoflavina Brillante FF; BTC; BTC-5N; Calceína; Azul de Calceína; Calcium Crimson -; Calcium Green; colorante Calcium Green-1 Ca<sup>2+</sup>; Calcium Green-2 Ca<sup>2+</sup>; Calcium Green-5N Ca<sup>2+</sup>; Calcium Green-C18 Ca<sup>2+</sup>; Calcium Orange; Calcofluor Blanco; Carboxi-X-rodamina (5-ROX); Cascade Blue<sup>TM</sup>; 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<sup>TM</sup>; Cy3.1 8; Cy3.5<sup>TM</sup>;

30 Cy3<sup>TM</sup>; Cy5.1 8; Cy5.5<sup>TM</sup>; Cy5<sup>TM</sup>; Cy7<sup>TM</sup>; 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; 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); Eucricina; EukoLight; cloruro de Europio (111); EYFP; Fast Blue; FDA; Feulgen (Pararosanolina); 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<sup>TM</sup>; FM 4-46; Fura Red<sup>TM</sup> (a pH alto); Fura

40 Red<sup>TM</sup>/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; Hidroxocoumarina; Hidroxietilbamidina (FluoroGold); Hidroxitriptamina; Indo-1, elevado en calcio; Indo-1 bajo en calcio;

45 Indodicarbocianina (DiD); Indotricarbocianina (DiR); Intrawhite 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; Lyso Tracker Blue; Lyso Tracker Blue-White; Lyso Tracker Green; Lyso Tracker Red; Lyso Tracker Yellow; LysoSensor Blue; LysoSensor Green; LysoSensor Yellow/Blue; Mag Green; Magdala 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 (mBBR-GSH); Monoclorobiman; MPS (Estilbeno Pironina Verde Metilo); NBD; NBD Amina; Rojo Nilo; Nitrobenzoxedidol; Noradrenalina; Rojo Rápido Nuclear; Amarillo Nuclear i; Nylosan lavina Brillante E8G; Oregon Green<sup>TM</sup>; Oregon Green<sup>TM</sup> 488; Oregon Green<sup>TM</sup> 500; Oregon Green<sup>TM</sup> 514;

55 Azul Pacífico; Pararosanolina (Feulgen); PBFI; PE-Cy5; PE-Cy7; PerCP; PerCP-Cy5.5; RojoTexas-PE (Rojo 613); Floxina B (Rojo Magdala); 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 Procion; 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 Bengala; R-ficocianina; R-ficoeritrina (PE); rsGFP; S65A; S65C; S65L; S65T; Sapphira GFP; SBFI; Serotonina; Rojo Brillante Sevron 2B; Rojo Brillante Sevron 4G; Rojo Brillante Sevron I B; Naranja Sevron; Amarillo L Sevron; sgBFP<sup>TM</sup> (súper brillante BFP); sgGFP<sup>TM</sup> (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™; Tiadibocianina (DiSC3); Rojo R de Tiazina; Naranja Tiazol; Tioflavina 5; Tioflavina S; Tioflavina TON; Thiolyte; Naranja de Tiozol; Tinopol CBS (Calcofluor Blanco); TIER; TO-PRO-1; TO-PRO-3; TO-PRO-5; TOTO-1; TOTO-3; Tricolor (PE-Cy5); Tetrametil Rodaminelso 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 15 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 marcaje 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 20 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 marcaje indirecto.

**[0096]** Como otro ejemplo de marcaje indirecto, una molécula adicional (que puede denominarse agente de unión) 25 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 30 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 35 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 marcaje indirecto incluyen la detección de inmunocomplejos primarios mediante una 40 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 45 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 50 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 55 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 60 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 inmunoprecipitación se usa una concentración constante de un 65 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, inmunoelectroforesis 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 procesamiento electroforético: al final del procesamiento, la matriz puede teñirse y usarse para escanear, autorradiografiar 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-mercaptoetanol o ditioneitol (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 isoelectroenfoque 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 %.

**[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 (2ª 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, <sup>125</sup>I). 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 Matsudaira, 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.

**[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, <sup>32</sup>P-radiomarcada), seguido por separación de los complejos de la sonda libre a través de un gel de poli(acrilamida 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 poliácridamida. 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 Nº 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  $^{125}\text{I}$  o  $^{131}\text{I}$ ) 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 Inmunoabsorbencia 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,  $\beta$ -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 un marcador detectable. Este tipo de ELISA es un simple “ELISA sándwich”. 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 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 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 antígenicamente 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 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 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 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, 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-benzotiazolin-6-sulfónico [ABTS] y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 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 nanocristales 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, hidrofiliicidad, 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 micromatrices 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 Versalinx™ (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 micromatrices 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 micromatrices incluyen imprenta robótica de contacto, eyección de tinta, aplicación puntual piezoeléctrica y fotolitografía. Diversos impresores robotizados de micromatrices 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 nanomicromatrices, 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 micromatrices de ADN es aplicable para las micromatrices de proteína. Para la presentación diferencial, micromatrices 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 nanocristales 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 micromatrices de captura forman la base de microplacas y micromatrices 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 micromatrices 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 micromatrices de captura se preparan por inmunización convencional (suero policlonal 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; BioInvent, Lund, Suecia; Affitech, Walnut Creek, CA; Biosite, San Diego, CA). Además de los anticuerpos convencionales, en las micromatrices 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 fotoentrecruzamiento 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 marcaje 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 aceluare 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 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

[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.

[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 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 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 en un pequeño subconjunto de las moléculas de anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales de la presente memoria incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” 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 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 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 inmuniza 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 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 aislarse fácilmente y secuenciarse usando procedimientos convencionales (por 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.*

[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 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 antigénicos 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 expresado.

10 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 antigénicos 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); Bruggermann *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 quiméricos 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 germinativa humana tal como ratones mutantes de la línea germinativa en la producción de anticuerpos humanos 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 quimérico 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 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 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 generarse anticuerpos humanizados de acuerdo con los métodos de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, Nature, 321:522-525 (1986), Reichmann *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 N°: 5.939.598 (Kucherlapati *et al.*), Patente de Estados Unidos N°: 6.130.364 (Jakobovits *et al.*) y Patente de Estados Unidos N°: 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 descrita 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 T<sub>m</sub> (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 T<sub>m</sub>. 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, 2ª 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 deseado 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.

### 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.

[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.

[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.

[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.

[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 (NH<sub>2</sub> u O) en la posición C6 de nucleótidos purina.

### 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 pueden poseer una actividad *de novo* independiente de cualquier otras 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 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 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 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 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 N°: 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 N°: 5.631.146) y teofilina (Patente de Estados Unidos N°: 5.580.737), así como moléculas grandes, tal como transcriptasa inversa (Patente de Estados Unidos N°: 5.786.462) y trombina (Patente de Estados Unidos N°: 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 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 N°: 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 preparar y usar aptámeros para unirse a una diversidad de moléculas diana diferentes en las Patentes de Estados Unidos N°: 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.

[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 N° 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 N° 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 N° 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 N° 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 N° 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 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 reacciones pueden encontrarse en las Patentes de Estados Unidos N° 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 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 N° 5.176.996, 5.645.985, 5.650.316, 5.683.874, 5.693.773, 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 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 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 N° 5.168.053, 5.624.824, 5.683.873, 5.728.521, 5.869.248 y 5.877.162.

**[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 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 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.

**[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 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 procesan en los ARNip dentro de la célula. Los ARNip sintéticos se diseñan generalmente usando algoritmos y un

5 sintetizador de ADN-ARN convencional. Los proveedores incluyen Ambion (Austin, Texas), ChemGenes (Ashland, Massachusetts), Dharmacon (Lafayette, Colorado), Glen Research (Sterling, Virginia), MWB Biotech (Eschersberg, Alemania), Prolog (Boulder, Colorado) y Qiagen (Ventspils, 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 describen cualquiera de los ARNip diseñados como se ha descrito anteriormente basándose en las secuencias para PAX2.

10 **[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 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 transportadores tales como liposomas catiónicos. Los medios apropiados para la transfección, incluyendo vectores virales, transfectantes químicos o métodos fisicomecánicos 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, 25 (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 modifican 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 transcrito 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.

65

### 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 transcrito. 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" *BioTechniques* 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* 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 deletado, 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 N° 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.

### 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 amplicón 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 N° 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 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, 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), direccionamiento mediado por receptor de ADN a través de ligandos específicos de células, direccionamiento 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 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, 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 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)).

[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 sistema de suministro se pueda integrar en el genoma del hospedador.

[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 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 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.

65



## 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 potenciadores 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, 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 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 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  $\beta$ -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 puomicina. 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 micofenólico (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 micofenólico) o higromicina, respectivamente. Otros incluyen

40 el análogo de neomicina G418 y puomicina.

## 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 (19ª 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 rellenos de fluidos y nutrientes, rellenos 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 tiocianico, 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-, trialkil 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
- 40 tejido tumoral (Senter, *et al.*, Bioconjugate Chem., 2:447-451, (1991); Bagshawe, K.D., Br. J. Cancer, 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)). Vehículos tales como "stealth" y otros liposomas conjugados con anticuerpo (incluyendo direccionamiento de fármaco mediado por lípido a
- 45 carcinoma colónico), direccionamiento mediado por receptor de ADN a través de ligandos específicos celulares, direccionamiento 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
- 50 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,
- 55 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 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
- 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 interaccionen 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.

**[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.

**[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 dos moléculas están próximas en el espacio, es decir, interaccionan 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 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) 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.

**[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 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 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 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 macromoléculas son ácidos nucleicos.

**[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 interaccionan con una diana específica (véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 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).

**[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 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 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 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. 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 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 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 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 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, 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 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), tetrahydroquinolinas 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.

**[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 redistribuciones 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 N°: 1, también están desveladas. Así, los productos producidos usando las estrategias de modelado molecular que implican las composiciones desveladas tales como la SEC ID N°: 1, también se consideran desveladas en la presente memoria.

[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 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 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, Polygen 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 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); McKinaly y Rossmann, 1989 Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 29, 111-122; Perry y Davies, QSAR: 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 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 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

[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 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 extracorporal, 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.

- [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 N° 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 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 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 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] Después 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 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 materia para ese reactivo o compuesto particular a menos que se indique específicamente de otro modo.

10

### i. Síntesis de ácido nucleico

[0266] Por ejemplo, los ácidos nucleicos tales como los oligonucleótidos a usar como cebadores se pueden preparar 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, 2ª 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 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 fosfite-triéster) y Narang *et al.*, Methods Enzymol., 65:610-620 (1980), (procedimiento de fosfotriéster). Se pueden preparar moléculas de ácido nucleico de proteínas usando procedimientos conocidos tales como los descritos por Nielsen *et al.*, Bioconjug. Chem. 5:3-7 (1994).

25

### II. Síntesis de péptidos

[0267] Un procedimiento de producción de las proteínas desveladas, tales como la SEC ID N°: 23, es unir dos o más 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-fluorenilmetiloxycarbonilo) o Boc (*tert*-butiloxycarbonilo). (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 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 (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 condensación de péptidos similares.

45

[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 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. 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)).

55

[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)).

60



## 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<sup>+</sup>) y negativas a receptor de andrógenos (AR<sup>-</sup>). La inducción de la expresión de DEFB1 dio como resultado una disminución del crecimiento celular en células AR<sup>-</sup> DU145 y PC3 pero no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de las células de cáncer de próstata AR<sup>+</sup> LNCaP. DEFB1 también causó la inducción rápida de apoptosis mediada por

caspara. 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  
10 mantuvieron a 37 °C y CO<sub>2</sub> 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  
15 directrices para el procesamiento, sección, caracterización histológica, purificación de ARN y amplificación por PCR de muestras. Después del examen patológico de secciones tisulares congeladas, se realizó microdissección de captura de láser (LCM) para garantizar que las muestras tisulares 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  
25 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 digirió 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  
30 digirió 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 ( $1 \times 10^6$ ) en placas de Petri de 100 mm y se dejaron crecer durante una  
35 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  $1 \times 10^6$  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).

**[0282]** El primer par para DEFB1 (Tabla 2) se generó a partir de la secuencia de DEFB1 publicada (Nº de acceso de  
55 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  
65 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  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$ . 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 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  $\mu\text{l}$  de 1 x tampón de unión de Anexina (Hepes 0,1 M/NaOH a pH 7,4, NaCl 1,4 M,  $\text{CaCl}_2$  25 mM) que contenía 5  $\mu\text{l}$  de Anexina V-FITC y 5  $\mu\text{l}$  de PI. Las células se incubaron a TA durante 15 min en oscuridad, después se diluyeron con 400  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{M}$ , mientras que las células de 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 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 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 ( $1,5 \times 10^5$ ) que contenían el sistema de expresión de DEFB1 se sembraron en placas de micropocillos de fondo de vidrio de 35 mm (Matek, Ashland, MA) y se trataron durante 24 horas con medio solamente o con medio que contenía PonA como se ha descrito previamente. A continuación, 10  $\mu\text{l}$  de una dilución de trabajo 30X de fluorometilcetona de péptido marcada con carboxifluoresceína (FAM-VAD-FMK) se añadió a 300  $\mu\text{l}$  de medio y se añadió a cada placa de 35 mm. Después, las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C en  $\text{CO}_2$  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 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 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 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° 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 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 N° 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.

**[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.

**[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 44% y 29% en las células DU145 y PC3, respectivamente.

**[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 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 la inducción con PonA (datos no mostrados).

**[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 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 verde en LNCaP (L), indicando que no había ninguna inducción de apoptosis por DEFB1.

### Conclusión

**[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 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<sup>-</sup>, pero no para células de cáncer de próstata sensibles a hormonas AR<sup>+</sup> 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<sup>-</sup> 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 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

[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.

### 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 CO<sub>2</sub> 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 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 10<sup>4</sup> 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).

[0300] *Ensayo de citotoxicidad de MTT:* Se transfectaron células DU145, PC3 y LNCaP (1 x 10<sup>5</sup>) 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 10<sup>3</sup> 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-2il]-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 10<sup>4</sup>) 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. Después, las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C con CO<sub>2</sub> 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  $1 \times 10^6$  células se recogieron mediante tripsinización 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 periodo 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 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 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 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 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.

### **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 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. 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.

**[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 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 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  $1 \times 10^6$  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 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 N° 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.

**[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 *Kpn1* y *Nhe1*. Los productos de PCR de promotor de DEFB1 se digirieron por restricción con *Kpn1* y *Nhe1* 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.

**[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  $1 \times 10^6$  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 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.

**[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 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, 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 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.

50

**[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 <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 preaclorada con Dynabeads de proteína A con anticuerpo específico de PAX2 o control "sin anticuerpo" [anticuerpos de control emparejados por isotipo]. Después se 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) 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.

**[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 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.

**[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 DU145 y PC3, pero no LNCaP. La muerte observada en LNCaP se debe a la transactivación de p53 de tipo silvestre existente en LNCaP después de la inhibición de PAX2.

**[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.

**[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 después del entrecruzamiento muestra un fragmento de promotor de 160 pb en DU145 y PC3, respectivamente.

## Conclusión

**[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 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.

## 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 atímicos. 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, 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 atímicos 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 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) <sup>2</sup> x longitud. Todos los animales se sacrifican mediante sobredosis de CO<sub>2</sub> cuando el tamaño del tumor alcanza 2 mm<sup>3</sup> o 6 meses después del implante; los tumores se extirpan, pesan y 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 clonan 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 secuencía, verifica e introduce mediante 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 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 transfección Codebreaker (Promega, Inc). Para confirmar las interacciones de ADN-proteína, los oligonucleótidos bicitenarios se marcarán con [<sup>32</sup>P] 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.

**Secuencia de reconocimiento Nº 1:** CTCCTTCAGTTCCGTCGAC (SEC ID Nº: 9)

**Secuencia de reconocimiento Nº 2:** CTCCTTCACCTTGGTCGAC (SEC ID NO: 10)

**Secuencia distorsionada Nº 1:** CTCCTTCACTCTGGTCGAC (SEC ID Nº: 11)

Secuencia de Reconocimiento nº 3:

**5'-TTAGCGATTAGAAGTTCACCCTTGACTGTGGCACCTCCC-3'** (SEC ID Nº: 12)

Secuencia de Reconocimiento nº 4:

**ACTGTGGCACCTCCCTTCACCTTGGTCGACGAGGTTGTGC** (SEC ID Nº: 13)

Secuencia Distorsionada nº 2:

**ACTGTGGCACCTCCCTTCACTCTGGTCGACGAGGTTGTGC** (SEC ID Nº: 14)

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

**Secuencia de reconocimiento Nº 1:** 5'-AGAAGTTCACCCTTGACTGT-3' (SEC ID Nº 24)

**Secuencia de reconocimiento Nº 2:** 5'-AGAAGTTCACGTTCCACTGT-3' (SEC ID Nº 25)

**Secuencia distorsionada Nº 1:** 5'-AGAAGTTCACGCTCTACTGT-3' (SEC ID Nº: 26)

Secuencia de Reconocimiento nº 3:

**5'-TTAGCGATTAGAAGTTCACCCTTGACTGTGGCACCTCCC-3'** (SEC ID Nº: 27)

Secuencia de Reconocimiento nº 4:

**5'-GTTAGCGATTAGAAGTTCACGTTCCACTGTGGCACCTCCC-3'**

(SEC ID Nº:

28)

Secuencia Distorsionada nº 2:

**5'-GTTAGCGATTAGAAGTTCACGCTCTACTGTGGCACCTCCC-3'**

(SEC ID Nº:

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 quiméricos 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'-ACTGCCCATTTGCCAAACAC-3' (SEC ID Nº 48);

RTTA3 (inverso) 5'-AAAATCTTGCCAGCTTTCCCC-3' (SEC ID Nº 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 N° 50); Inv5'IRES 5'-TAACATATAGACAAACGCACACCG-3' (SEC ID N° 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 hemocitos de Immortomouse usando los siguientes cebadores y condiciones de PCR: Immol1, 5'-GCGCTTGTTGTC GCCATTGTATTC-3' (SEC ID N° 52); Immol2, 5'-GTCACACCACAGAAGTAAGGTTCC-3' (SEC ID N° 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.
- 10 Para genotipar ratones anulados de PAX2, los siguientes cebadores y condiciones de PCR se usan: PAX2 dir 5'-GTCGGTTACGGAGCGGACCGGAG-3' (SEC ID N° 54); PAX2Inv 5'-CACAGAGCATTGGCGATCTCGATGC - 3' (SEC ID N° 55); 94 °C 1 min, 65 °C 1 min, 72 °C 30 seg, 36 ciclos para proporcionar una banda de 280 pb.

- [0334] Estudios con animales de péptido de DEFB1:** A ratones atímicos (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 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'-CCTGGCACCCAGCACAAT-3'	SEC ID N° 30
DEFB 1	5'-GTTGCCCTGCCAGTCGCCATGAGAACTTCCTAC-3'	SEC ID N° 31
	Antisentido (5'-3')	
β-actina	5'-GCCGATCCACACGGAGTACT-3'	SEC ID N° 32
DEFB 1	5'-TGGCCTTCCCTCTGTAACAGGTGCCTTGAATT- 3'	SEC ID N° 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'-GAAGUCAAGUCGAGUCUAUUU-3'	SEC ID N° 15
Secuencia B	5'-GAGGAAACGUGAUGAAGAUUU - 3'	SEC ID N° 3
Secuencia C	5'-GGACAAGAUUGCUGAAUACUU - 3'	SEC ID N° 5
Secuencia D	5'-CAUCAGAGCACAUCAAUUCUU - 3'	SEC ID N° 7
	Antisentido (5'-3')	
Secuencia A	5'-AUAGACUCGACUUGACUUCUU - 3'	SEC ID N° 2
Secuencia B	5'-AUCUUAUCACGUUCCUCUU - 3'	SEC ID N° 4
Secuencia C	5'-GUUUCAGCAAUCUUGUCCUU - 3'	SEC ID N° 6
Secuencia D	5'-GAUUUGAUGUGCUCUGAUGUU - 3'	SEC ID N° 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'-CCACCCATGGCAAATTCATGGCA - 3'	SEC ID N° 16
BAD	5'-CTCAGGCCTATGCAAAAAGAGGA - 3'	SEC ID N° 17
BID	5'-AACCTACGCACCTACGTGAGGAG - 3'	SEC ID N° 18
BAX	5'-GACACCTGAGCTGACCTTGG - 3'	SEC ID N° 19
	Antisentido (5'-3')	
GAPDH	5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCAACC - 3'	SEC ID N° 20
BAD	5'-GCCCTCCCTCCAAAGGAGAC - 3'	SEC ID N° 21
BID	5'-CGTTCAGTCCATCCCATTCTG - 3'	SEC ID N° 22
BAX	5'-GAGGAAGTCCAGTGTCCAGC - 3'	SEC ID N° 23

35

## 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-canceroso 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 cardíaca 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 <sup>22</sup>	Muertes estimadas en EEUU <sup>22</sup>	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
Ovário	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 CO<sub>2</sub> 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 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 (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 x 10<sup>6</sup> 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 GAPDH como un gen constitutivo para normalizar el contenido inicial de ADNc total. La expresión relativa se calculó como la proporción entre cada gen y GAPDH. 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 x 10<sup>6</sup> 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  
10 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 AT1R.

15 **[0346]** Se sabe que AngII afecta directamente a la proliferación de las células de cáncer de próstata mediante la activación mediada por AT1R 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.

20 **[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  
25 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  
30 redujo los niveles de proteína fosfo-STAT3 (Figura 23C). Estos resultados demuestran que PAX2 está regulado mediante AT1R en células de cáncer de próstata.

**[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  
35 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.

**[0349]** Se usa ampliamente 5-aminoimidazol-4-carboxamida-1- $\beta$ -D-ribofuranósido (AICAR) como un activador de  
40 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  
45 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,  
50 fosfo-STAT3 que regula la expresión de PAX2 también estaba suprimido (Figura 23C).

**[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  $\mu$ M 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.

**[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 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® (Genentec, Inc.).

**[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 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.

**[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 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 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 convertora 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

**[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).

**[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 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 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

**[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 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 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 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
- 10 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 CO<sub>2</sub> 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 Hollines 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'.
- 25 Los conjuntos incluyen aquellos para la proteína ribosómica L32 (el amplicón 3' y el amplicón 5' están alejados 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 ClaI y KpnI. Los productos de PCR de hBD-1 se sometieron a digestión de restricción con ClaI y KpnI 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 ClaI y KpnI, que sirvió como un vector intermedio con fines de orientación. La construcción pTRE2/hBD-1 se digirió con ApaI y KpnI para escindir 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 ApaI y KpnI. 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 ( $1 \times 10^6$ ) 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.
- [0365] Inmunocitoquímica:** para verificar la expresión de proteína hBD-1 se sembraron células DU145 y hPrEC en
- 55 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. Después de la inducción, las células se lavaron en PBS 1 x y se fijaron durante 1 h a temperatura ambiente con paraformaldehído a 4%. Después, 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 policlonal primario de conejo anti-BD-I humano (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ) diluido 1:1000 en solución de bloqueo. Después 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-2il]-2,5-difenil tetrazolio (MTT). Las células DU145, LNCap, PC3 y PC3/AR+ introducidas mediante co-transfección con el plásmido pvgRXX y la construcción pIND/hBD-1 o el plásmido de control pvgRXX se sembraron en una placa de 96 pocillos con 1-5 x 10<sup>3</sup> 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 bloqueos 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.

**Tabla 7.** Secuencias de cebadores de QRT-PCR

	Con sentido (5' -3 ')	Antisentido (5' -3 ')
β-actina	CCTGGCACCCAGCACAAAT (SEC ID N° 30)	GCCGATCCACACGGAGTACT (SEC ID N° 32)
hBD-1	TCAGCAGTGGAGGGCAATG (SEC ID N° 60)	CCTCTGTAACAGGTGCCTTGAAT (SEC ID N° 61)
cMYC	ACAGCAAACCTCCTCACAGCC (SEC ID N° 62)	TGGAGACGTGGCACCTCTTG (SEC ID N° 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,

CaCl<sub>2</sub> 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 (1,5-3 x 10<sup>5</sup>) 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 CO<sub>2</sub> 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.

- [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). 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.

- [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 QRT-PCR 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 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 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 QRT-PCR. 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 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).

- [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 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 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 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 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-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 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 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 colocación de tinción verde y roja procedente de AO y de EtBr, respectivamente. De manera inversa, no hubo modificaciones observables con respecto a la 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 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 CO<sub>2</sub> 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. Después, 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	Deleción a C, GCC-GC	Cambio de fase	Sin actividad	Isaacs <i>et al.</i> 1991
LNCaP	Sin deleción, 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)	AUCUUAUCACGUUCCUCUU (SEC ID Nº: X)
C	GGACAAGAUUGCUGAAUACUU (SEC ID Nº: X)	GUAUUCAGCAAUCUUGUCCUU (SEC ID Nº: X)
D	CAUCAGAGCA-CAUCAAUUCUU (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  $1-2 \times 10^4$  células durante una noche sobre placas de cultivo de seis pocillos (BD Falcon, Estados Unidos). Después las células se trataron solo con medio, ARNip no específico como control negativo o ARNip de PAX2 y se dejó incubar durante 6 días. Después 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  $1-5 \times 10^3$  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 después del tratamiento. Después 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.

- 20 **[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,  $1-2 \times 10^4$  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 CO<sub>2</sub> 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.

- 30 **[0389] RT-PCR cuantitativa en tiempo real:** Para verificar cambios en la expresión génica después de disminución de la expresión de PAX2 en líneas celulares PC3, DU145 y LNCaP, se realizó RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Se recogieron aproximadamente  $1 \times 10^6$  células por tripsinización y las células se aclararon en PBS. Después 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) 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 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 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	CCACCCATGGCAAATTCATGGCA (SEC ID N°: 16)	TCTAGACGGCAGGTCAGGTCAACC (SEC ID N°: 20)
BAD	CTCAGGCCTATGCAAAAAGAGGA (SEC ID N°: 17)	GCCCTCCCTCCAAAGGAGAC (SEC ID N°: 21)
BID	AACCTACGCACCTACGTGAGGAG (SEC ID N°: 18)	CGTTCAGT CCAT CCC ATTT CT G (SEC ID N°: 22)
BAX	GACACCTGAGCTGACCTTGG (SEC ID N°: 19)	GAGGAAGTCCAGTGTCCAGC (SEC ID N°: 23)
BCL-2	TATGATACCCGGGAGATCGTGATC (SEC ID N°: 65)	GTGCAGATGCCGGTTCAGGTACTC (SEC ID N°: 66)
AKT	TCAGCCCTGGACTACCTGCA (SEC ID N°: 67)	GAGGTCCCGGTACACCACGT (SEC ID N°: 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 transfectaron con ARNip de PAX2, ARNip no específico o solo con medio. Después del tratamiento, las células se lavaron una vez con PBS y se teñieron 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]** *Análisis 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 sondear 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 transfectaron 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 QRT-PCR. 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 teñirían 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 rojo. 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, Prapotnich 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.; Burkeholder, 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. Discenza, 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., Haploinsufficiency and reduced expression of genes localized to the 8p chromosomal region in human prostate tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 2003, 37, (3), 306-13.
- 15 Coultas, 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 AM: Increased detection of mammary carcinoma cells in marrow smears using antisera to epithelial membrane antigen. *Br J Cancer* 1981, 44:85-90.
- 20 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.
- 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, 22, (50), 8145-55.
- 25 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 Dorflier, 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: the role of PAX2 in urogenital tract development. *Int J Dev Biol* 2002; 46(4):535-544.
- 40 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, 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.
- 45 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 Xenoantigen Vaccination for Prostate Cancer Immunotherapy. *J Immunol* 2001, 167, (12), 7150-7156.
- 50 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, 12:725-729.
- 65

- 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.
- 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.
- 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.
- 25 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.
- 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, Guiliano A: Detection of metastatic breast cancer by b-hCG polymerase chain reaction. *Int J Cancer* 1996, 69:369-374.
- Hueber *et al.* PAX2 inactivation enhances cisplatin-induced apoptosis in renal carcinoma cells, *Kidney Int.* Apr 2006; 69(7):1139-45.
- 30 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* 2006; 94(4):552-560.
- 40 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, McCray PB Jr. Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene.* 24 Ene 2001; 263(1-2):211-8.
- 50 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, 72:268-276.
- 55 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 cooperates with Bax to induce apoptosis. *Mol. Cell Biol.* 22, 6158-6169.
- 60 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- $\kappa$ 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 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
- 5 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.
- Khoubehi B, Kessler AM, Adshear JM, Smith GL, Smith RD, Ogden CW. Expression of the developmental and  
10 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.
- 15 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- $\beta$ 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.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 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  
35 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.
- 40 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  
45 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.
- 50 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, Tsuchin OS, Fleiszig SM. Lar surface epithelia express mRNA for human beta defensin-2 *Exp Eye Res.* Nov 1999; 69(5):483-90.
- 55 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., Foulle, 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.
- 60 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.
- 65 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  
10 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  
20 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.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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.
- 40 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, Krithivas K, Probert K, Bryant M, Haltom E, aynes L, Kaplan I, Bublely 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  
50 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.
- 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*  
65 *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, (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 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 of urogenital tissues. *J Clin Invest.* 15 Abr 1998; 101 (8):1633-42.
- 20 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 grade prostatic intraepithelial neoplasia]. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2004, 10, (1), 26-8, 31.
- 30 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), 181-215.
- 40 Ylikoski A, Pettersson K, Nurmi J, Irjala 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 member. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296(4):1019-1025.
- 45 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

AUAGACUCGACUUGACUUCUU

### 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  
CAUCAGAGCACAUCAAUUCUU
8. SEC ID Nº: 8  
GAUUUGAUGUGCUCUGAUGUU
- 5 9. SEC ID Nº: 9  
CTCCCTTCAGTTCCGTCGAC
10. SEC ID Nº: 10  
CTCCCTTCACCTTG GTCG AC
11. SEC ID Nº: 11  
CTCCCTTCACTCTG GTCGAC
- 10 12. SEC ID Nº: 12  
ACTGTGGCACCTCCCTTCAGTTCCGTCGACGAGGTTGTGC
13. SEC ID Nº: 13  
ACTGTGGCACCTCCCTTCACCTTGGTCGACGAGGTTGTGC
- 15 14. SEC ID Nº: 14  
ACTGTGGCACCTCCCTTCACTCTGGTCGACGAGGTTGTGC
15. SEC ID Nº: 15  
GAAGUCAAGUCGAGUCUAUUU
16. SEC ID Nº: 16  
CCACCCATGGCAAATTCATGGCA
- 20 17. SEC ID Nº: 17  
CTCAGGCCTATGCAAAAAGAGGA
18. SEC ID Nº: 18  
AACCTACGCACCTACGTGAGGAG
- 25 19. SEC ID Nº: 19  
GACACCTGAGCTGACCTTGG
20. SEC ID Nº: 20  
TCTAGACGGCAGGTCAGGTCAACC
21. SEC ID Nº: 21  
GCCCTCCCTCCAAAGGAGAC
- 30 22. SEC ID Nº: 22  
CGTTCAGTCCATCCCATTCTG
23. SEC ID Nº: 23  
GAGGAAGTCCAGTGTCAGC
- 35 24. SEC ID Nº: 24  
AGAAGTTCACCCTTGA CTGT
25. SEC ID Nº: 25  
AGAAGTTCACGTTCCACTGT
26. SEC ID Nº: 26  
AGAAGTTCACGCTCTACTGT
- 40 27. SEC ID Nº: 27  
TTAGCGATTAGAAGTTCACCCTTGA CTGTGGCACCTCCC
28. SEC ID Nº: 28  
GTTAGCGATTAGAAGTTCACGTTCCACTGTGGCACCTCCC
- 45 29. SEC ID Nº: 29  
GTTAGCGATTAGAAGTTCACGCTCTACTGTGGCACCTCCC
30. SEC ID Nº: 30  
CCTGGCACCCAGCACAAT
31. SEC ID Nº: 31  
GTTGCCTGCCAGTCGCCATGAGAACTTCCTAC
- 50 32. SEC ID Nº: 32  
GCCGATCCACACGGAGTACT
33. SEC ID Nº: 33  
TGGCCTTCCCTCTGTAACAGGTGCCTTGAATT
- 55 34. SEC ID Nº: 34 (gen, promotor y exón 1 de proteína de caja emparejada (PAX2) de Homo sapiens;  
REFERENCIA L09748 AF433639)
- MDMHCKADPFSAMHRHGGVNQLGGVVFVNGRPLPDVVRQRIVELAHQGVPCDISRQLRVSHGCVSKILGRYY  
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 nccatagctcc tctgacccga ggccccaaga cggcgggcac aggaaccctt gggacgtcct
181 ggcctccagge tggacgtagg cggaggtggc aggagtggac aaaccacaggc gggteccacg
241 acgccccttt cctcgggtct ctcttgttt cagccagccg ctctcgcccc tggteccctc
301 ttccctgagt tagggctcct tgtctccagc cacctcgagc cctgtcccg cctcggcggc
361 cctgcccctt gggcctccca gatctctctg gcgggtcccc ctgccttacc agctcccggc
421 tgtggcggcg tcttcgcctg ctcttcacat ncacacagct gctgggagag gaggaaggaa
481 aggcggncgc gccgcggatg gatccgagac ggtagatttg gtgcggctc gcaaaactctg
541 ggaaacttaa ngccggttct tccgcccctc tncaactatg nccagcgagg cccggtcgcg
601 cgcgctcacc ccgcggggac cctttccttt tectgtattt cggctgcggc tgtttcgctt
661 cctctgggtct cccagccttt ggagtggctt ccctggccct gcactccgtt ccttttcggc
721 cgcgcccggc tgtcgctgc cccacccctc cgcaggtccc acggtcgagg cggcgatgac
781 tgtggaggta acgccgggga cgtcctgggt cagcctgcac cgtctccctc gaccacagcc
841 cgatgaggcc gcgggctccg ggccggctgc taagagagtt aatcattact tcgccagcga
901 cactcagcct ccccttcoga ctctctcgcc cggcctaggg gaggagggga ggggacagct
961 ggccagggtg ggacttcggc ttgcacaaa ccagcctctt caggcctccc agagacaggt
1021 ggtggcttct cagtccctc ggcaactctc taaggctctc tttcttccc tctgtctct
1081 cctcctctcg agctcctcc cagccaggcc tctccccacc gtctctgtc cgtcttggct
1141 ttgactgatt aactgcaggt cctgggagaa ccaactttct ttgtttgga cgggaccgga
1201 cgggatttcc ttccctaggt ctccgccaat gggccagctc ctcccgagg ttttggcgga
1261 ctggctgaag aggaccgcgc ctgaggccac aattaaccog gctgttggtg gtggtggtg
1321 gggggtgggc agtgaggat ttaaccgatc ctctagcagc tgcgctggtg cagttgggag

```



1381 ggggggtgcag gaagtgggaa tggaggagtg gcaggaggta tagacagagg gaagaacgat  
 1441 aaacctggac aggtgtggca tagccaatag aaggggaaac aaaataaaac aggaaggcgg  
 1501 cgcggggagag aatccccagt aacctttata ggattgaagt tgggtggaaa acgccacctc  
 1561 ctgccctacc ttagcactca gatccctcct ttacctcttt gtgaaagggt aagagttcag  
 1621 aaagctggcc atttactcca taatctacta gagaaatgtc tgggtttgca aaatgcctat  
 1681 tgattagctc catggagtag acaagacagg cgtaattatc cccattttac aggtgagaaa  
 1741 actgagtcctc aaagaagcaa agggactgtg tatgtagtgg ctgtcacttt ttctgtagg  
 1801 ctgtggggtg agtgggccct ttagctgtgc agaggtccat gggatatcag ggaggggta  
 1861 caggctgtgt ccaggctctga gccagaagta ccagggcctc acggggctcc tagccctttt  
 1921 agcttgttct ctgttggaaca ggaccttcac tcttactctc tagacctgct ggctgggttt  
 1981 ctcccagctt cgctattttt tcagtccctc agtagagtgg cccatgggcg gtacccacct  
 2041 ggctggcccg tgcactaag aggcagcttt ggtggccaag tggcttgcat tgttgttgc  
 2101 cctcaaaagg cctgtgaagg gctgggcagg ctgggcaagac ctcttgtgag gggaaagcta  
 2161 gattaaaggg ggtaaggatc ctggaggata aaggccaagc acgtgcgcct ggactccaca  
 2221 ggaccaacag accgagcggg cggggcngc tgggagtcag gcccccggg cttaacgcag  
 2281 ggagcccaaa tattgggaac aaaagcagga aaagaagagt gagagcagga gggaggggag  
 2341 gagcgaggaa gcagaaatta ggggtcttta gatgaaaaaa aaaagaaagt agctttaggg  
 2401 ggaaatgtct gtgagtggtg aaattgcagc ccatggtgct ccatattgta ccagaagctc  
 2461 ttccaaaaaa aaaaaaaaaa accatcctcc aacgtgacca gagggccagg cagggggaag  
 2521 ggcggggaga gaatggggag gaggaggggg aaaggccggg caggagccgg tcaggccctt  
 2581 ctgcggaaag ggtgggggtg taagtttcgg ctccctggga tctgacagcc gaggttatgc  
 2641 gccctggggg gcgcggggac ccagaggggg agtgagcctc ggttggctcg ctctggagtt  
 2701 cggttgtctg aagaactttt attttcttt ttggtggtga cttctaaaat tgggaataat  
 2761 ccagaaatga agctcagctg cggagctgca gctctgttct cctctctccc cctgcctttc  
 2821 tgcttctctt ccttcggac tactttctc ccttgggttc taaatagctt ttccctctc  
 2881 gaactttaat gcatttaatt tggctccgcg tgtggggagc atttctggg gagatgcatt  
 2941 taatttcgga atttctaate cctccctca gaccccggtc ctagctcccc tagcgcctcc  
 3001 ccgggaagtg gaaggaggaa ggcaggtccc ggcacgggg gagggcgcg gctgggatgc  
 3061 ~~tcgcgggccc cctccgtct caccaggct cagccgctt cccaagctac tggaggccgg~~  
 3121 gcgcctgggc cccgggtcag ggccttgcac gaagaagaga ggcaaccccc gctttctgcc  
 3181 ttttcttcgc ctgggcaaga aaacgctggg ccagggaact ggaacccgga aaacaggaga  
 3241 aagggtttnt ggaaggcanc gggagcgggt ggcagncggg gcancgggca ntggactagg  
 3301 tctcaacccg cacttcactt ttgcacaaca tgcacagaaa cgcatttgag agccctggag  
 3361 tcgcgcttgg ctgggttgg ggcgcgggtg cgtgggtaca ctcgaggtcg ggggtccctat  
 3421 ccgccacccc gacacctaca cccagtgcag agcaggcgcg gccagccag acaaccaggc  
 3481 cggcagtagc tcggcctgga gggcggagge aaggttgggg gccgccaggc gcctgggcaa  
 3541 gcctggcagg gaaggagcc gagaaggcaa aggagccgag atccacaagg aagattmntt  
 3601 gggcagatca gatgcacaga ggcggctaata cagcaaatc ccgagatggg tttagagca  
 3661 actcccaaaa agtttatatt cctttaaata tccgcaggg aggggggctc cttgtttgaa  
 3721 gtgtaaatgc cctagggtt ggggggtggaa gggccgcttt gaaaacacca gagagaaaag  
 3781 gttcatttag aggcggacgg gaaaagcaac caacctgac aggtcggagc ccgggtagtg  
 3841 tttgggggtg ggtngttttc tttctttctc tttcttttcc ctttctctc tctttcttcc  
 3901 cttttgtgtn tttntttgt tttttttnt tntttttnt ttaantggc ttcttgcttc  
 3961 cccccacccc tctactagac tctatagaag aaagagaaca gaaaaggggg agtcagagga  
 4021 gcggccagtg actggatgaa ggccagccct tcatcctgga gccccaggag aaggcagagc  
 4081 ttgggagaaa aggggttcct aatctccagg gagcattact ctttgactct ctgacccag  
 4141 gaatgggctg gacgctaatt ggggaagcggc caggaaaccg gcctggcggg agagttagtg  
 4201 tccagctagt gcagtgtctg gaagacgac ccaggagcag gggggactct caggggctac  
 4261 ctgggaatgg gactateaga aggttcttta ctccanana ggtgcatgtg aaggacaggt  
 4321 gtgtgaggac aacttccagc acacttggcg cattaagtcc cttctctac aaaatggaaa  
 4381 atccttctcg cccaacatgt gaaatgctt gttgtgggca cccacatttc atggtacttg  
 4441 taacatagga catgtctagc tggttctaga aaaatctgtg tctgtgtgga aggggggggg  
 4501 tttactcaca gctttcttcc ttcaatagtt cacacacccc gagacaaatt cctggatgac  
 4561 caacttggag agacctgggg caaaggttac tttagtctc agctcctcta aataaggacc  
 4621 ctttctcaac gttcctttca cccagttct gggtaatta ctccagttc gtgcgtgttc  
 4681 gtgggggtgt gaggccaaag caaacccggg agcgccatct gcaggcctca agagggaagag  
 4741 actgacctta gaggctaggc cctgcgtctt caacctctag cccaagggaa ccaacctgcc  
 4801 tagccaccca agggaaagtg gataggggct gggaggggca ggcggtgag agtgttttcc  
 4861 tccagactt taccocgag ggtgattaa cttattgggc tctggaggat acaggaggga  
 4921 gggcaaatgc caggatccca gcggaccag gccccacagg agtgagaggt tcagaaacct  
 4981 gtcccgtga gctggcctg agctcctcct gaggaataag ggcaccccaa aaaccgggt  
 5041 acaagacgcc cagtagtagt agttaggctg agtcaggcag gtgcatctct ccccatggta  
 5101 tctgcggccc aggtccgggc cagaggggag gtagcgcgag tccgcggcgc ttccgcgggg  
 5161 cgcccggaac tgcagacggg ggtggaggga atctcgatt cgggctgcaa gagcgtgag  
 5221 caagcttcgc cgagccggcc tttcgcagac ccagggaagc ggggggagg agcgaaggag  
 5281 ggagagagag ttaaaacatc agcttgaaag tgcceaatat gattttatta agacggaggg  
 5341 gaaaattatt ttcatgaaag attctcccc gaatatattct tgtacttaac ccagttagga

5401 agacaaaggg cttctttctg cctgggtgcgg tgcgagcggg cccagcgcag caagggagct  
5461 agtgccaaaag agaactgcgg agggctccggc aggaagtggg acgtcccggt ggttgcgct  
5521 cctgcgctcg ccccgatcc accgagctag cagcgggagg cgctcagccg cgtccgcagc  
5581 ctcctcttct cccagccgg ggagagccag cctcgtctcc cacatcctct gccgccagcg  
5641 acctgcagct ccgcactgtt tccctccctt gtacccctt cccagtcacc cgaggggtca  
5701 gaaaccaagt ccccggtct tcccgccatc cgtcgggtcc caccgaggca ggtgggtact  
5761 cggcgagggt cttcagctcg attctgaacc aagcgttctg gactgcccag acccggtggg  
5821 caaggggact ggggaggccc tgcgcacagt cgcgtggaac gggaggggac aagacaaact  
5881 gctggacact ttccgtgga atgagaagtg ggggtgctg ggggtgggag gtacctccgg  
5941 agggaaaggc caaagggaag gaccagaaag agaggaagga agagccggga aggaacggaa  
6001 gggaactcag agccgaggg ggtggggttg gggctagggg tgcgcactgg gcccggggccc  
6061 gcgcggccca ggcgggact ggcagtgga tggcagggtt gggcgagtta gaactgagag  
6121 cccggttca cagcgcagcg cgtccgagg cctctgtcg ttacctgaat attcattaga  
6181 ctgacgcctc ttatccctt tctaacgttt atcttatcgg cgagtttctg ttctcagtg  
6241 agtcttaac cggggtccc attcccttc ccccggtccg ctcctctcc ctcctcttc  
6301 ttcgcccgtt gctcctccc tccctccctc ccattctctc ctcctctgccc ctcctcttgc  
6361 cggcacccga gtgacaggtt cggggccctc ctgcgcgaag ctccgggctc cagcgtggc  
6421 gaatcacaga gtggtggaat ctattgcctt tgtctgacaa gtcacccatc tcccgccgcg  
6481 gggaggggga ggaggtcttg agggggttt gcagctttta gagagacaca caccgggagc  
6541 cgaggtctca gtctccggcc gactcttcta gcagccgcaa cccacctggg gccagcccg  
6601 agctgccagc gcgctcggc tccctccctc ctcctccgccc cttcggccgc ggcggcgctg  
6661 gcctgccttt tccgggggag gggggttggc ccgcgcgctc cctcccgca ggcgccacct  
6721 cggacatccc cgggattgct acttctctgc caacttcgccc aactcggcag cacttgagga  
6781 ggcgcggctc cctcccggc gccctctgac cgcgcccgcc ccgcgcgctc tccgacaccc  
6841 gcctctcgga tgaacaggtt ccaggggagc tgagcgagtc gcctccccc cccagcttca  
6901 gccctggctg cagctgcagc gcgagccatg cgcgccagtc gcaccccgcc ccggccccc  
6961 ccccggggag cattctgctg accgccagc ccgagccccc gacagtgcca agttgaggct  
7021 actgcggttg caagctccgg ccaacccgga ggagccccc cggggagcgc agtgttgccg  
7081 ccccgccccc cgcgcgcgccc gcagcagccg ggcgttccat catctccct ccccccagct  
7141 cctccctttt tctcctcaag tccctgaagt gaggttgaga ggcgacacgg cggcgccggc  
7201 cgcgctgctc ccgctcctct gcctcccat ggatatgcac tgcaaacgag acccttctc  
7261 cgcgatgcac cgtgagtacc cgcgccggc tctgtcccg gtcgggctc tccgtcccaa  
7321 cctgttccag t

36. SEC ID N°: 36 (Gen de caja emparejada 2 (PAX2) de Homo sapiens; REFERENCIA NM\_003987)

MDMHCKADPFSAMHPGHGGVNQLGGVFVNGRPLPDVVRQRIVELAHQGVPRCDISRQLRVSHGCVSKILGRY  
YETGSIKPGVIGGSKPKVATPKVVDKIAEYKRONPTMFAWEIRDRLAEGICDNDTPSPVSSINRIIRTKVQ  
QPFHPTPDGAGTGVTA PGHTIVPSTASPPVSSASNDPVGSYSINGILGIPRSNGEKKRKRDEVEVYTDPAHIR  
GGGGLHLVWTLRDVSEGSVPNGDSQSGVDSLRLKHLRADTFTQQOLEALDRVFERPSYPDPVQASEHIKSEOG  
NEYSLPALTPGLDEVKSSLSASTNPGLGSNVSGTQTYPVVTGRDMASTERLPGYPPHPPTGQGSYPTSTLAG  
MVPGSEFSGNPYSHPQYTAYNEAWRFSNPALLSSPYYYSAAPRSAPAAAAAYDRH

37. SEC ID N°: 37 (Gen de caja emparejada 2 (PAX2) de Homo sapiens; REFERENCIA NM\_003987)

1 aggcctccagt ctcggccgga gtcttctcgc agccgcaacc cacctggggc cagcccagag  
61 ctgcccagcgc cgtcggctc cctccctccc tcccgccctc tcggccgagg cggcgctgcg  
121 ctgccttttc cgggggaggg ggctggccc ggcgcctccc ctcggcagg cgcacctcg  
181 gacatccccc ggattgctac ttctctgcca acttcgcca ctcgcccag cttggagagg  
241 cccggctccc ctcgggccc cctctgacgc ccccgcccc gcgcgctctc cgaccacgc  
301 ctctcggatg accaggttcc aggggagctg agcagatcgc ctcggccgccc cagcttcagc  
361 cctggctgca gctgcagcgc gaggcatgag ccccgagtc acccgggccc ggcccacgc  
421 cccggggcca ttctgctgac cggccagccc cagagcccca cagtggcaag ttgaggctac  
481 tgagattgca agctccggcc aaccggagg agccccagc gggagcgcag tgttgccccc  
541 cccgcccccg cgcgccccgc agcagccggc cgttccacta tctccctcc cccacgctc  
601 ctcccttttc tctcagatc ctgaagtga gtttgagagg cgacacggcg cggcgccggc  
661 cgtgctccc gctcctctgc ctcggcatg atatgcactg caaagcagac ccttctccg  
721 ccatgacccc agggcacggg ggtgtgaacc agctcggggg ggtgtttgtg aacggccggc  
781 cctacccga cgtggtgagg cagcgcatcg tggagctggc ccaccagggt gtgcggccct  
841 gtgacatctc ccggcagctg cgggtcagcc acggtctgtg cagcaaaatc ctgggcaggt  
901 actacgagac cggcagcatc aagccgggtg tgatcgggtg ctccaagccc aaagtggcga  
961 cggccaaagt ggtggacaag attgtgaat acaaacgaca gaacccgact atgttcgct  
1021 gggagattcg agaccggctc ctggccgagg gcatctgtga caatgacaca gtgcccagcg

```

1081 tctcttccat caacagaatc atccggacca aagttcagca gcctttccac ccaacgcggg
1141 atggggctgg gacaggagtg accgcccctg gccacaccat tgttcccagc acggcctccc
1201 ctccctgttc cagcgccctcc aatgacccag tgggaccta ctccatcaat gggatcctgg
1261 ggattcctcg ctccaatggt gagaagagga aacgtgatga agttgaggtg tacactgatc
1321 ctgcccacat tagaggaggt ggaggtttgc atctggtctg gactttaaga gatgtgtctg
1381 agggctcagt cccaatgga gattcccaga gtggtgtgga cagtttgagg aagcacttgc
1441 gagctgacac cttcaccacg cagcagctgg aagctttgga tcgggtcttt gagcgtcctt
1501 cctaccctga cgtcttcag gcacagagc acatcaaac agaacagggg aaogagtact
1561 ccctcccagc cctgacccct gggcttgatg aagtcaagtc gagtctatct gcacccacca
1621 accctgagct gggcagcaac gtgtcaggca cacagacata ccagttgtg actggtgtg
1681 acatggcgag caccactctg cctggttacc cccctcacgt gcccctcact ggccagggaa
1741 gctacccac ctccaccctg gcaggaatgg tgcctgggag cgagttctcc ggcaaccctg
1801 acagccccc ccagtaacg gcctacaacg aggtctggag attcagcaac ccgccttac
1861 taagttcccc ttattattat agtgccgcc cccggtccgc ccctgcccgt gctgcccgtg
1921 cctatgacg ccactagtta ccgcggggac cacatcaagc ttcaggcgga cagcttcggc
1981 ctccacatcg tcccgtctg accccacccc ggaggaggag aggaccgacg cgacgcgagt
2041 cctcccggcc accgcccag cctcacccca tcccacgacc cccgcaaccc ttcacatcac
2101 cccctcgaa ggtoggacag gacgggtgga gccgtgggag ggaccctcag gcccgggccc
2161 gcgcgcccca gcccgccctg ccgcccctcc ccgctgcct ggactgcgag cgccgtgag
2221 ggggattcgg ccagctcgt cccggcctcc accaagccag ccccgaggcc cgcagccac
2281 cctgcccagc togggcgca cctgtggcg ccgcccggat gttctgtga cacacaatca
2341 gcgcgggacg cagcgcgcc cagccccggg caccgcctc ggacgtcgg gcgcaggag
2401 gcttcgctgg aggggctggg ccaaggagat taagaagaaa acgactttct gcaggaggaa
2461 gagcccgctg ccgaatccct gggaaaaatt cttttccccc agtgccagcc ggactgccct
2521 cgccttccgg gtgtgccctg tcccagaaga tggaatgggg gtgtgggggt ccggctctag
2581 gaacgggctt tggggggcgc aggtctttcc aaggttggga cccaaggatc gggggggcca
2641 gcagcccgca ccgacgagc cggactctcg gctcttcact gctcctcctg cctgctag
2701 ttccccaggg ccgggcacct cctgctgca gaccggctc tcagccctgc cttgccccta
2761 cctcagcgtc tcttccacct gctggcctcc cagtttcccc tctgcccagt ccttgcctg
2821 tcccttgacg ccctgcatcc tctcctctga ctgcagccc catcggaagc tctcccggga
2881 ccgcccagg accagtttcc atagactgag gactggggtc ttctccagc agttacttga
2941 tgccccctcc ccgacacag actctcaatc tgccgggtgt aagaaccggt tctgagctgg
3001 cgtctgagct gctcggggt ggaagtggg ggtgcccac tccactctc ccateccctc
3061 ccagcctcct cctcggcag gaactgaaca gaaccacaaa aagtctacat ttatttaata
3121 tgatggtctt tgcaaaaagg aacaaaacaa cacaaaagcc caccaggctg ctgctttgtg
3181 gaaagacggt gtgtgtogtg tgaaggcgaa acccggtgta cataaccctc cccctccgc
3241 ccgccccgc ccggccccgt agagtccctg tcgcccgcg gccctgectg tagatacgcc
3301 ccgctgtctg tgcgtgaga gtgcgcgctc gctggggggg aaggggggga cacagctaca
3361 ccgcccattaa agcacagcac gtccctgggg gggggggcat tttttatgtt acaaaaaaaa
3421 attacgaaag aaaagaaatc tctatgcaaa atgacgaaca tggctcgtg gactcctctg
3481 gcctgttttg ttggctcttt ctctgtaatt ccgtgttttc gctttttcct cctgcccct
3541 ctctccctct gccctctct cctctccgct tctctcccc tctgtctctg tctctctcg
3601 tctctgtcgc tctgtctgt ctgtctctgc tctttctctg gcctctctcc ccagacctgg
3661 ccgpgccgcc ctgtctccgc aggtctagatc cgaggtggca gctccagccc ccgggtctgc
3721 cccctcgcg gctgccccg ccgcccccg gcgcccgaag gccggggcgc ccgctccgc
3781 ccgtagttg ctctttcggg agtggcgatg ccgctgcat gtctcctcac ccgtggatcg
3841 tgacgactcg aaataacaga aacaaagtca ataaagtga aataaataaa aatccttgaa
3901 caaatccgaa aaggcttgg gtccctgccc agatctctct cccttgcgag ccctttttat
3961 ttgagaagga aaaagagaaa agagaatcgt ttaagggaac ccggcgcccc gccaggctcc
4021 agtggccccg acggggcggc gagggcggcg agggcgccga ggtccggccc atccagctcc
4081 tgtggggctg gccgggcaga gaccccgac ccaggcccag gcctaacctg ctaaatgtcc
4141 ccggacggtt ctggtctcct cggccacttt cagtgcgtcg gttcgttttg attcttttcc
4201 ttttgtgcac ataagaaata aataataata ataaataaag aataaaattt tgtatgtcaa
4261 aaaaaaaaaa aaaaaa

```

38. SEC ID N°: 38 (Gen de caja emparejada 2 (PAX2) de Homo sapiens, variante de transcrito b; REFERENCIA NM\_000278)

MDMHCKADPPSAMHPGHGGVNQLGGVFNGRPLPDVVRQRIVELAHQGVPCDISRQLRVSHGCVSKILGRY  
YETGSIKPGVIGGSKPKVATPKVVDKIAEYKRONPTMFAWEIRDRLAEGICDNDTVPSVSSINRIIRTKVQ  
QPFHPTPDGAGTGVTAPGHTIVPSTASPPVSSASNDPVGYSINGILGIPRSNGEKKRDEDEVSEGSVPNGD  
SQSGVDSLRLKHLRADTFTQQQLEALDRVFERPSYPDVFQASEHIKSEQGNEYSLPALTPGLDEVKSSLSAST  
NPELGSNVSGTQTYPVVTGRDMASITLPGYPHPVPTGQGSYPTSTLAGMVPGSEFSGNPFYSHPQYTAYNEA  
WRF9NPALLSSPYYYSAAPRSAPAAAAAAYDRH

39. SEC ID N°: 39 (Gen de caja emparejada 2 (PAX2) de Homo sapiens, variante de transcrito b; REFERENCIA NM\_000278)

1 aggtccaggt ctccggccga gtctttctcgc agccgcaacc cacttggggc cagcccagag  
 61 ctgccagcgc cgctcggtcc cctccctccc tcccgccctc tcggccgcgc cggcggtgccc  
 121 ctgecttttc cgggggcggg ggcttggccc gcgcgctccc ctcccgagg cggcacctcg  
 181 gacatccccg ggattgctac ttctctgcca acttcgcca ctcgccagca cttggagagg  
 241 cccggctccc ctcccggcgc cctctgacgc ccccgcccc gcgcgctctc cgaccaccgc  
 301 ctctcggtg accaggttcc aggggagctg agcgagtgc ctcggcgcc cagcttcagc  
 361 cctggctgca gctgcagcgc gaggcatgc ccccgagtc acccgggccc ggcccacgc  
 421 cccggggcca ttctgctgac cgcccagccc cgagcccca cagtggcaag ttgcggtac  
 481 tgcagttgca agctccggcc aaccggagg agccccagc gggagcgcag tgttgcgcc  
 541 cccgcccccg cgcgccccgc agcagccggg cgttactca tctccctcc cccaccgtcc  
 601 ctcccttttc tctcaagtc ctgaagtga gtttgagg cgacacggcg gggcgggccg  
 661 cgctgctccc gctctctgc ctcggcatgg atatgactg caaagcagac ccttctccg  
 721 cgatgcaccc agggcacggg ggtgtgaacc agctcgggg ggtgtttgtg aacggccgc  
 781 ccctaccga cgtggtgagg cgcgcctgc tggagctggc ccaccagggt gtgcggccct  
 841 gtgacatctc cggcagctg cgggtcagcc acggctgtgt cagcaaatc ctgggcagg  
 901 actacgagac cggcagcatc aagccgggtg tgatcggtg ctccaagccc aaagtggcga  
 961 cggccaaagt ggtggacaag attgctgaat acaaacgaca gaaccggact atgttcgct  
 1021 gggagattcg agaccggctc ctggccgagg gcatctgtga caatgacaca gtgcccagc  
 1081 tctcttccat caacagaatc atccggacca aagttcagca gcctttccac ccaacggccg  
 1141 atggggctgg gacaggagtg accgccccg gccacaccat tgttccagc agggcctccc  
 1201 ctctgttttc cagcgctcc aatgacccag tgggactcta ctccatcaat gggatcctgg  
 1261 ggatttctcg ctccaatggt gagaagagga aacgtgatga agatgtgtct gagggtcag  
 1321 tccccaatgg agattccag agtggtgtgg acagtttgc gaagcacttg cgagctgaca  
 1381 ccttccacca gcagcagctg gaagctttgg atcggtctt tgagcgctct tctaccctg  
 1441 acgtcttcca ggcatcagag cacatcaaat cagaacaggg gaacgagtag tccctccag  
 1501 ccctgacccc tgggcttgat gaagtcaagt cgagtctatc tgcattccac aacctgagc  
 1561 tgggcagcaa cgtgtcaggc acacagacat acccagttgt gactggtcgt gacatggcga  
 1621 gcaccactct gcctggttac cccctccacg tgcccccac tggccaggga agctaccca  
 1681 cctccaccct ggcaggaaat gtgcctggga gcgagttctc cggcaacccc tacagccacc  
 1741 cccagtacac ggcctacaac gaggttggga gattcagca ccccgctta ctaagttccc  
 1801 cttattatta tagtgcgcgc ccccggtccc cccctgcgc tgcctccgct gctatgacc  
 1861 gccactagtt accgcgggga ccacatcaag cttcaggccg acagcttcgg cctccacatc  
 1921 gtcccgctct gacccacccc cggagggagg gaggaccgac gcgacgcgat gcctccggc  
 1981 caccgcccga gcctcaccac atcccaagac ccccgcaacc cttcacatca cccctccga  
 2041 aggtcggaca ggacgggtgg agccgtgggc gggaccctca gggccggggc cgccgcccc  
 2101 agccccgcct gccccccctc cccgctgccc tggactgcgc gggcgcgtag ggggattcg  
 2161 ccccgctcg tcccgccctc acccaagcca gccccagga cgcgacgga cctcccgga  
 2221 ctggggcgcg acctgctggc gcgcgcggga tgtttctgtg acacacaatc agcgcgga  
 2281 gcagcgcggc ccagcccggc gcacccgctc cggacgctcg ggcgcccagg ggcctcgctg  
 2341 gaggggctgg gccaaaggaga ttaagaagaa aacgacttct tgcaggaggga agagccgct  
 2401 gccgaatccc tgggaaaaat tcttttcccc cagtgcagc cggactgccc tgccttccg  
 2461 ggtgtgccc gtcccagaag atggaatggg ggtgtggggg tccggctcta ggaacgggt  
 2521 ttggggcgct caggtcttcc caaggttggg acccaaggat cggggggccc agcagccgc  
 2581 accgactgag ccggactctc ggctcttcac tgcctctcct ggctgccta gttcccgag  
 2641 gcccggcacc tctgtctgc agaccggct ctcagccctg ccttgcctcc acctagcgt  
 2701 ctcttccacc tgcctgctcc ccagtttccc ctcctgccag tccctgcct gtccctgac  
 2761 gccctgcac ctcctccctg actgcagcc ccactggag ctcctccggg accgcgcag  
 2821 gaccagttc catagactgc ggaactgggt cttcctccag cagttacttg atgccccct  
 2881 ccccgacaca gactctcaat ctgcccgtgg taagaaccgg ttctgagctg gcgtctgagc  
 2941 tgcctggggg tgggaagtgg gggctgccc ctcactcct cccatccct cccagcctcc  
 3001 tctccggca ggaactgaac agaaccacaa aaagtctaca tttatttaat atgatggtct  
 3061 ttgcaaaaag gaacaaaaca acacaaaagc ccaccaggct gctgctttgt ggaaagacgg  
 3121 tgtgtgctgt gtgaaggcga aaccgggtgt acataacccc tccccctcc ccccgcccc  
 3181 cccggccccg tagagtcctc gtcgcccgc ggcctgccc gtagatacgc cccgctgct  
 3241 gtgctgtgag agtcgcccgt cgctgggggg gaaggggggg acacagctac acgcccatta  
 3301 aagcacagca cgtcctgggg gaggggggca ttttttatgt taaaaaaa aattacgaaa  
 3361 gaaaagaaat ctctatgcaa aatgacgaac atggctctgt ggactcctct ggctgtttt  
 3421 gttggctctt tctctgtaat tccgtgtttt cgctttttcc tccctgcccc tctctccctc  
 3481 tgcctctctc tctctccgc tctctccccc ctctgtctct gtctctctcc gtctctgtg  
 3541 ctctgtctct tctgtctctg ccttctctcc ggctctctcc cccagacctg gcccggcgc  
 3601 cctgtctccg caggctagat ccgaggtggc agctccagcc cccgggctcg cccctcgcg  
 3661 ggcgtgcccc gcgcgccccg ggcggccgaa ggccggggcg cccgtcccg cccgtagtt  
 3721 gctctttcgg tagtgccgat gcgcctgca tgtctctca cccgtggatc gtgacgactc

```

3781 gaaataacag aaacaaagtc aataaagtga aaataaataa aaatccttga acaaatccga
3841 aaaggcttgg agtcctcgcc cagatctctc tccctgcga gcccttttta tttgagaagg
3901 aaaaagagaa aagagaatcg ttttaaggaa cccggcgccc agccaggctc cagtggcccg
3961 aacggggcgg cgagggcgcc gagggcgccg aggtccggcc catccagtc ctgtggggct
4021 ggccgggcag agaccccgga cccaggccca ggctaacct gctaaatgtc cccggacggt
4081 tctgggtctc tcggccactt tcagtgcgct gggtcgtttt gattcttttt cttttgtgca
4141 cataagaaat aaataataat aataaataaa gaataaaatt ttgtatgtca aaaaaaaaaa
4201 aaaaaaa

```

40. SEC ID N°: 40 (Gen de caja emparejada 2 (PAX2) de Homo sapiens, variante de transcrito c; REFERENCIA NM\_003988)

```

MDMHCKADPFSAMHPGHGGVNLGGVFNRRPLPDVVRQRIVELAHQGVPCDISRQLRVSHGCVSKILGRY
YETGSIKPGVIGGSKPKVATPKVVDKIAEYKRQNPTMFAWEIRDLLAEGICDNDTVPSVSSINRIIRTKVQ
QPFHPTPDGAGTGVTAPGHTIVPSTASPPVSSASNDPVGSYSINGILGIPRSNGEKKRDEDEVSEGSVPNGD
SQSGVDSLRLKHLRADTFTQOOLEALDRVFERPSYPDVFOASEHIKSEQGNEYSPLALTPGLDEVKSSLSAST
NPBLGSNVSGTQTYPVVTGRDMASSTLPGYPPHVPPTGQGSYPTSTLAGMVPEAAVGPSSSLMSKPGRKLAE
VPPCVQPTGASSPATRTATPSTRPTTRLGDSATPPY

```

5

41. SEC ID N°: 41 (Gen de caja emparejada 2 (PAX2) de Homo sapiens, variante de transcrito c; REFERENCIA NM\_003988)

```

1 aggetccagt ctccggcoga gtcttctcgc agccgcaacc cactgggggc cagcccagag
61 ctgccagcgc cgctcggctc cctccctccc tcccggccct teggcgcgcg cggcgtgcgc
121 ctgccttttc cgggggcggg ggcctggccc gcgcgtccc ctccgcagg cgcacctcg
181 gacatccccg ggattgctac ttctctgcca acttcgcca ctccgcagg ctggagagg
241 cccggctccc ctccggcgc cctctgaccg ccccgcccc gcgcgtctc cgaccacgc
301 ctctcggatg accaggttcc aggggagctg agcagatcgc ctccccgcg cagcttcagc
361 cctggctgca gctgcagcgc gagccatgcg ccccagtcg accccggccc ggcccacgc
421 cccggggcca ttctgctgac cggccagccc cgagcccca cagtggcaag ttgaggctac
481 tgcagttgca agctccggcc aaccggagg agcccagcg gggagcgag tgttgcgcc
541 cccgcccccg cgcgccccgc agcagccgg cgttcactca tcctccctcc cccaccgtcc
601 ctcccttttc tcctcaagtc ctgaagtga gtttgaggc cgacacggcg gcggcgccg
661 cgctgctccc gctcctctgc ctcccatgg atatgcactg caaagcagac cccttctccg
721 cgatgcaccc agggcacggg ggtgtgaacc agctcgggg ggtgtttgtg aacggccggc
781 ccctacccga cgtggtgagg cagcgcacgc tggagctggc ccaccagggt gtgaggccct
841 gtgacatctc cggcagctg cgggtcagcc acggctgtgt cagcaaaat ctgggcagg
901 actcggagac cgcgagcatc aagccgggtg tgatcgggtg ctccaagccc aaagtggcga
961 cgcctaaagt ggtggacaag attgctgaat acaaacgaca gaaccgact atgttcgct
1021 gggagattcg agaccggctc ctggccgagg gcattctgtg caatgacaca gtgccagcg
1081 tctcttccat caacagaatc atccggacca aagttcagca gcctttccac ccaacgcgg
1141 atggggctgg gacaggagtg accgcccctg gccacacat tggtcccagc acggcctccc
1201 ctctgttttc cagcgcctcc aatgacccag tgggatccta ctccatcaat gggatcctgg
1261 ggtctcctcg ctccaatggt gagaagaggg aaagtgtatg agatgtgtct gagggctcag
1321 tccccaatgg agattcccag agtgggtgtg acagtttgag gaagcacttg cgagctgaca
1381 ccttcaccca gcagcagctg gaagctttgg atcgggtctt tgagcgtcct tcctacctg
1441 acgtcttcca ggcacagag cacatcaaat cagaacaggg gaacagagta tccctcccag
1501 ccctgacccc tgggcttgat gaagtcaagt cgagtctatc tgcattccac aacctgagc
1561 tgggcagcaa cgtgtcaggc acacagacat accagttgt gactggtcgt gacatggcga
1621 gcaccactct gcctgggttac cccctcacg tgccccccac tggccaggga agctaccca
1681 cctccaccct ggcagggaatg gtgcctgagg ctgcagttgg tcctcatcc tcctcatga
1741 gcaagccggg gaggaagctt gcagaagtgc ccccttgtgt gcaacccact ggagcgagtt
1801 ctccggcaac ccgtacagcc acccccagta cacggcctac aacgaggctt ggagattcag
1861 caaccccgcc ttactaagtt ccccttatta ttatagtgc gcccccgggt ccgcccctgc
1921 cgctgctgce gctgcctatg acgcgacta gttaccgagg ggaccacatc aagcttcagg
1981 ccgacagctt cggcctccac atcgtcccg tctgaccca ccccgaggg agggaggacc
2041 gacgcgagc gatgcctccc ggccaccgccc ccagcctcac cccatcccac gaccccgca
2101 acccttcaca tcacccccct ogaaggtcgg acaggacggg tggagccgtg ggcgggacc
2161 tcaggcccg gcccgcggcc cccagcccg cctgcgcgcc ctcccgcct gcctggactg
2221 cgcggcgccg tgagggggat toggcccagc togtccggc ctccaccaag ccagcccca
2281 agcccgccag ccaccctgcc ggactogggc gcgacctgct ggcgcgcgcc ggatgtttct
2341 gtgacacaca atcagcgcgg accgcagcgc ggcccagccc cgggcacccg cctcggacgc
2401 tcgggcgcca ggaggcttcg ctggaggggc tgggccaagg agattaagaa gaaaacgact
2461 ttctgcagga ggaagagccc gctgccgaat ccctgggaaa aattcttttc cccagtgcc
2521 agccggactg cctcgcctt cggggtgtgc cctgtcccag aagatggaat gggggtgtgg

```

```

2581 ggggtccggct ctaggaacgg gcttttgggg cgtoaggctt ttccaaggtt gggacccaag
2641 gatcgggggg cccagcagcc cgcaccgatc gagccggact ctgggtcttt cactgctcct
2701 cctggcctgc ctagttcccc agggcccgcc acctcctgct gcgagaccog gctctcagcc
2761 ctgccttgcc cctacctcag cgtctcttcc acctgctggt cctccagttt cccctcctgc
2821 cagtccttcg cctgtccctt gacgcccctgc atcctcctcc ctgactcgca gcccacatcg
2881 acgctctccc gggaccgccc caggaccagt ttccatagac tgcggactgg ggtcttcctc
2941 cagcagttac ttgatgcccc ctccccgcac acagactctc aatctgcccg tggttaagaac
3001 cgggttctgag ctggcgtctg agctgctgct ggggtggaagt ggggggctgc ccactccact
3061 cctcccatcc cctcccagcc tctcctcccg gcaggaactg aacagaacca caaaaagtct
3121 acattttattt aatatgatgg tctttgcaaa aaggaacaaa acaacacaaa agcccaccag
3181 gctgctgctt tgtggaaaga cgggtgtgtg cgtgtgaagg cgaaacccgg tgtacataac
3241 ccctcccccct ccgccccgccc ccgccccggcc ccgtagagtc cctgtcggcc gccggccctg
3301 cctgtagata cggcccgtgt tctgtgctgt gagagtgcgc gctcgtggg ggggaagggg
3361 gggacacagc tacacgccc taaagcaga gcacgtcctg ggggaggggg gcatttttta
3421 tgttacaaaa aaaaattacg aaagaaaaga aatctctatg caaaatgacg aacatgggtc
3481 tgtggactcc tctggcctgt tttgttggct ctttctctgt aattcctgtt ttctgctttt
3541 tctcctctgc cctctctctc ctctgcccc ctctcctctc cgtctctctc cccctctgtc
3601 tctgtctctc tccgtctctg tctgtctctt ctgtctgtct ctgtctcttc ctccgctctc
3661 ctccccagac ctggcccggc cgcctctgtc ccgcaggcta gatccgaggt ggcagctcca
3721 gcccccgggc tgcccccctc gggggcgtgc cccgcgcgcc ccgggcccgg gaaggccggg
3781 ccgccccgtc ccgccccgta gttgctcttt cggtagtggt gatgcgccct gcatgtctcc
3841 tcaccogtgg atcgtgacga ctcgaaataa cagaaacaaa gtcaataaag tgaaaataaa
3901 taaaaatcct tgaacaaatc cgaaaaggct tggagtctc gccagatct ctctccctg
3961 cgagcccttt ttatttgaga aggaaaaaga gaaaagagaa tcgtttaagg gaacccggcg
4021 cccagccagg ctccagtggc ccgaacgggg cggcgagggc ggogagggcg ccgaggtccg
4081 gcccattcca gtctgtggg gctggccggg cagagacccc ggaccaggc ccaggcctaa
4141 cctgctaaat gtcccggac ggttctgggt tctcggcca ctttcagtgc gtcgggtcgt
4201 tttgattctt tttcttttgt gcacataaga aataataaat aataataaat aaagaataaa
4261 attttgtatg tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

42. SEC ID N°: 42 (Gen de caja emparejada 2 (PAX2) de Homo sapiens, variante de transcrito d; REFERENCIA NM\_003989)

```

MDMHCKADPPFSAMHPGHGGVNLGGVFNGRPLPDVVRQRIVELAHQGVVRPCDISRQLRVSHGCVSKILGRY
YETGSIKPGVIGGSKPKVATPKVVDKIAEYKRQNPMTFAWEIRDRLLAEGICDNDTVPVSVSSINRIIRTKVQ
QPFHPTPDGAGTGVTPGHTIVPSTASPPVSSASNDPVGSYSINGILGIPRSNGEKRKRDEDEVSEGSVPNGD
SQSGVDSLRLKHLRADTFTQQQLEALDRVFERPSYPDVFOASEHIKSEQGNEYSLPALTPGLDEVKSSLSAST
NPELGSNVSGTQTYPVVTGRDMASSTLPGYPPHPPTGQGSYPTSTLAGMVPVPGSEFSGNPFYSHPOYTAYNEA
WRFSNPALLMPPPGPPLPLPLPMTATS YRGDHIKLQADSFGLHIVPV

```

5

43. SEC ID N°: 43 (Gen de caja emparejada 2 (PAX2) de Homo sapiens, variante de transcrito d; REFERENCIA NM\_003989)



```

1  aggctccagt  ctccggccga  gtcttctcgc  agccgcaacc  cacctggggc  cagcccagag
61  ctgccagcgc  cgctcggctc  cctccctccc  tcccggccct  tcggccgcgg  cggcgctgcg
121  ctgccctttc  cgggggcggg  ggcctggccc  gcgcgctccc  ctccgcagg  cgccacctcg
181  gacatccccg  ggattgctac  ttctctgcca  acttcgccaa  ctgccagca  cttggagagg
241  cccggctccc  ctcccgggcg  cctctgacgc  ccccgcgcc  gcgcgctctc  cgaccaccgc
301  ctctcggatg  accaggttcc  aggggagctg  agcagtcgc  ctccccgc  cagcttcagc
361  cctggctgca  gctgcagcgc  gagccatgcg  ccccagtcg  accccggccc  gggccaccgc
421  cccggggcca  ttctgctgac  cgcccagccc  cgagcccga  cagtggcaag  ttgcggtac
481  tgcagttgca  agctccggcc  aaccggagg  agcccagcg  gggagcgag  tgttgcgccc
541  cccgcccccg  cgcgcgccgc  agcagccggg  cgttactca  tctccctcc  cccaccgtcc
601  ctcccttttc  tcctcaagtc  ctgaagttga  gtttgagagg  cgacacggcg  gcggcgggcg
661  cgctgctccc  gctcctctgc  ctccccatgg  atatgcactg  caaagcagac  cccttctccg
721  cgatgcaccc  agggcacggg  ggtgtgaacc  agctcggggg  ggtgtttgtg  aacggccggc
781  ccctaccoga  cgtggtgagg  cagcgcatcg  tggagctggc  ccaccagggt  gtgcgccct
841  gtgacatctc  ccggcagctg  cgggtcagcc  acggctgtgt  cagcaaatc  ctgggcaggt
901  actacgagac  cggcagcatc  aagccgggtg  tgatcggtgg  ctccaagccc  aaagtggcga
961  cgcccaaagt  ggtggacaag  attgctgaat  acaaacgaca  gaaccgact  atgttcgcct
1021  gggagattcg  agaccggctc  ctggccgagg  gcatctgtga  caatgacaca  gtgccagcg
1081  tctcttccat  caacagaatc  atccggacca  aagttcagca  gcctttccac  ccaacgcggg
1141  atggggctgg  gacaggagtg  accgcccctg  gccacaccat  tgttcccagc  accggcctcc
1201  ctctgttttc  cagcgccctc  aatgaccag  tgggatccta  ctccatcaat  gggatcctgg
1261  ggattcctcg  ctccaatggg  gagaagagga  aacgtgatga  agatgtgtct  gagggctcag

```

1321 tccccaatgg agattcccag agtgggtggtg acagttttgcg gaagcacttg cgagctgaca  
1381 ccttcaccca gcagcagctg gaagcttttg atcgggtctt tgagcgtcct tcctaccctg  
1441 acgtctttcca ggcatcagag cacatcaaat cagaacaggg gaacgagtag tccctcccag  
1501 ccttgacccc tgggcttgat gaagtcaagt cgagtctatc tgcattccac aaccttgagc  
1561 tgggcagcaa cgtgtcaggc acacagacat acccagttgt gactggctgt gacatggcga  
1621 gcaccactct gcctggttac cccctcacg tgccccccac tggccaggga agctaccca  
1681 cctccaccct ggaggaatg gtgcttgga gcgagttctc cggcaaccg tacagccacc  
1741 cccagtagac ggctacaac gaggcttgga gattcagcaa ccccgctta ctaatgccgc  
1801 ccccggtcc gccctgccg ctgctgccg tgctatgac cgccactagt taccggggg  
1861 accacatcaa gcttcaggcc gacagcttcg gcctccacat cgtcccgctc tgacccacc  
1921 cggaggagg ggaggacga cgcgacgga tgctcccg ccaccgccc agcctcacc  
1981 catccacga ccccgcaac ccttcacatc accccctcg aaggctcggc aggacgggtg  
2041 gagcgtggg cgggacctc aggcggggc ccgcggccc cagcccgcc tgccgccc  
2101 ccccgctgc ctggactgc cggcgctg agggggattc ggcccgctc gtccggcct  
2161 ccaccaagcc agcccgaa cccggcagg accctgccg actcgggcgc gacctgctg  
2221 cgcgcggcg atgtttctg gacacacat cagcgaggc cgcagcgcg cccagcccc  
2281 ggacccgctc tggagcctc gggcgccagg aggtctcgt ggaggggctg ggccaaggag  
2341 attaagaaga aaacgactt ctgcaggag aagagccgc tgccgaatcc ctgggaaaa  
2401 tctttttcc cagtgccag cggactgac ctgccttcc ggggtgtgcc tgctccaga  
2461 gatggaatg ggggtgtggg gtccgctctc aggaacgggc ttggggggc tcaggtctt  
2521 ccaagggtg gacccaagg tgggggggc cagcagccg caccgatga gccggactc  
2581 cggctcttca ctgctcctc tggcctgct agtcccccag ggcccgccac ctctgctgc  
2641 gagacccgctc tctcagcct gccttgcctc taccctcagc tctctccac ctgctggcct  
2701 cccagtttcc cctcctgcca gtccttgcgc tgtccctga cgccctgcat cctcctcct  
2761 gactgcagc cccatcggc gctctcccg gaccgcgca ggaccagtt catagactg  
2821 cggactggg tctcctcca gcagttact gatgccccct ccccgacac agactctcaa  
2881 tctgcgggtg gtaagaacc gttctgagc ggcgtctgag ctgctcggg gtggaagtg  
2941 ggggctgccc actccactc tccatcccc tccagcctc ctctccggc aggaactgaa  
3001 cagaaccaca aaaagtctac atttatttaa tatgatggtc ttgcaaaaa ggaacaaaac  
3061 aacacaaaag cccaccaggc tgcgtcttg tggaaagac gtgtgtgtc tgtgaaggc  
3121 aaaccgggtg tacataacc cctccctcc gcccgcccc gccggcccc gtagagtc  
3181 tgtcgccgc cggccctgc ttagataac cccgctgtc tgtgtgtga gactcgccg  
3241 tgcgtgggg ggaaggggg gacacageta cagcccat aaagcacagc acgtcctgg  
3301 ggaggggggc attttttatg ttacaaaaa aaattacgaa agaaaagaaa tctctatga  
3361 aaatgacgaa catggtcctg tggactcctc tggcctgtt tgttggctc tctctgtaa  
3421 ttcggtgtt tgcgttttcc cctcctgccc ctctctccct ctgcccctc ctctctcct  
3481 cttctctccc cctctgtctc tgtctctctc cgtctctgtc gctctgtct gtctgtctc  
3541 gctctttcct cggcctctct ccccgacct ggcccgccc ccctgtctc gcaggctaga  
3601 tccgaggtg cagctccagc ccccggtcc gccccctgc gggcgtgccc cgcgcgccc  
3661 gggcgccga aggcggggc gcccgctcc gcccgtagt tgcctttcg gtagtggcg  
3721 tgcgcccctc atgtctcctc acccgtagt cgtgacgact cgaaataaca gaaacaaagt  
3781 caataaagtg aaaataaata aaaatcctt aacaaatccg aaaaggctg gactcctgc  
3841 ccagatctct cctccctgag agccctttt atttgagaag gaaaaagaga aaagagaatc  
3901 gtttaaggga acccgcgcc cagccaggct ccagtgccc gaacggggc gcgaggcg  
3961 cgaggggcgc gaggtccggc ccatccagc cctgtggggc tggccgggca gagaccccg  
4021 acccaggccc aggcctaacc tgctaaatg ccccgacag ttctgtgtc ctcgccact  
4081 ttcagtgct cgggtcgtt tgattcttt tcttttgtc acataagaaa taaataata  
4141 taataaataa agaataaaa tttgtatgtc aaaaaaaaa aaaaaaaa

44. SEC ID N°: 44 (Gen de caja emparejada 2 (PAX2) de Homo sapiens, variante de transcrito e; REFERENCIA NM\_003990)

5

MDMHCKADPFSAMHPGHGGVNLGGVFNVRPLPDVVRQRIVELAHQGVPCDISRQLRVSHGCVSKILGRY  
YETGSIKPGVIGGSKPKVATPKVVDKIAEYKRQNPMTFAWEIRDRLAEGICDNDTVPSVSSINRIIRTKVQ  
QPFHPTPDGAGTGVTAPGHTIVPSTASPPVSSASNDPVGSYSINGILGIPRSNGEKRKRDEVEVYTDPAHIR  
GGGGLHLVWTLRDVSEGSVPNGDSQSGVDSLRLKHLRADTFTQQQLBALDRVFERPSYPDVQASEHIKSEQG  
NEYSPLPALTPGLDEVKSSLSASTNPELGSNVSGTQTYPVVTGRDMASTTLPGYPPHPVPTGQGSYPTSTLAG  
MVPGSEPSGNPYSHPOYTAYNEAWRFSNPALLMPPPGPPLPLPLPMTATSYRGDHIKLOADSFGLHIVPV

45. SEC ID N°: 45 (Gen de caja emparejada 2 (PAX2) de Homo sapiens, variante de transcrito e; REFERENCIA NM\_003990)

10

```
1  aggcctccagt ctcgggccga gtctttctgc agccgcaacc cacctggggc cagcccagag
61  ctgccagcgc cgctcggctc cctccctccc tccggccctc tcggccgggg cggcgtgggc
121 ctgccctttc cggggggcgg ggccctggccc gcgcgctccc ctcccgcagg cggcacctcg
```

181 gacatccccg ggattgctac ttctctgcc aacttcgcaa ctccgagca cttggagagg  
 241 cccggctccc ctccggcgc cctctgacc ccccgcccc gcgctctc cgaccacgc  
 301 ctctcggatg accaggttcc aggggagctg agcagctcgc ctccccgc cagcttcagc  
 361 cctggctgca gctgcagcgc gagccatgcg ccccgagtcg acccggccc ggcccaaccg  
 421 cccggggcca ttctgctgac cgcgcagccc ctagcccccga cagtggcaag ttgctgctac  
 481 tgcagttgca agctccggcc aaccggagg agccccagcg gggagcgcag tgttcgcccc  
 541 cccgcccccg cgcgccccgc agcagccggg cgttcaactc tctccctcc cccaccgtcc  
 601 ctcccttttc tctcaagtc ctgaagtga gtttgagagg cgaacggcg gggcgggcgc  
 661 cgtcgtctcc gctcctctgc ctcccatgg atatgcactg caaagcagac ccttctccg  
 721 cgtgcacccc agggcacggg ggtgtgaacc agctcggggg ggtgtttgtg aacggcgggc  
 781 cctacccega cgtgggtgagg cagcgcacgc tggagctggc ccaccagggt gtgaggccct  
 841 gtgacatctc ccggcagctg cgggtcagcc acggctgtgt cagcaaaatc ctgggcagggt  
 901 actacgagac cggcagcctc aagccgggtg tgcctgggtg ctccaagccc aaagtggcga  
 961 cggccaaagt ggtggacaag attgctgaat acaaacgaca gaaccgact atgttcgcct  
 1021 gggagattcg agaccggctc ctggccgagg gcatctgtga caatgacaca gtgcccagcg  
 1081 tctcttccat caacagaatc atccggacca aagttcagca gcttttccac ccaacgcggg  
 1141 atggggctgg gacaggagtg accgcccctg gccacaccat tgttcccagc acggcctccc  
 1201 ctctctgttc cagcgccctcc aatgaccag tgggatccca ctccatcaat gggatcctgg  
 1261 ggattctctg ctccaatggg gagaagagga aacgtgatga agttgaggta tacactgatc  
 1321 ctgcccacat tagaggaggt ggaggtttgc atctggtctg gactttaaga gatgtgtctg  
 1381 agggctcagt ccccaatgga gattcccaga gtggtgtgga cagtttgccg aagcacttgc  
 1441 gagctgacac cttcaccag cagcagctgg aagctttgga tgggtcttt gagcgtcctt  
 1501 cctaccctga cgtcttccag ccatcagagc acatcaaact agaaccggg aacgagtact  
 1561 cctcccccgc cctgacccct gggcttgatg aagtcaagtc gactctatct gcacccacca  
 1621 accctgagct gggcagcaac gtgtcaggca cacagacata ccagttgtg actggtcgtg  
 1681 acatggcgag caccactctg cctgggtacc cccctcagct gccccccact ggccagggaa  
 1741 gctaccccc cctcaccctg gcaggaaatg tgctggggag cgagttctcc ggcaaccctg  
 1801 acagccaccc ccagtacacg gctacaaac aggcctggag attcagcaac cccgcttacc  
 1861 taatggcgcc ccccggtccg cccctgcgcg tgcctgcgct gctatgacc gccagtagtt  
 1921 acccggggga ccacatcaag ctccaggccg acagcttcgg cctccacatc gtcgccgtct  
 1981 gacccacccc cggaggggagg gaggaccgac gcgacgcgat gcctcccgcc caccgcccc  
 2041 gcctcacccc atcccaagac ccccgcaacc ctccacatca ccccccctga aggtcggaca  
 2101 ggaacgggtg agccgtgggc gggacccctc ggcggggccc cgcggccccc ccccgccct  
 2161 gccgcccctc cccgctgccc tggactgcgc ggcgcgctga gggggattcg gccagctcg  
 2221 tcccgccctc caccagcca gccccgaagc ccgcccagca cctgcccga ctccggcgcg  
 2281 acctgctggc gcgcgcggga tgtttctgtg acacacaatc agcgcggacc gcagcgcggc  
 2341 ccagccccgg gcacccgcct cggacgcctg ggcggcagga ggcttcgtg gaggggctgg  
 2401 ccgaaggaga ttaagaagaa accgaactttc tgcaggagga agagccgct gccgaatccc  
 2461 tgggaaaaat tcttttcccc cagtgcacgc cggactgccc tgccttccg ggtgtgccct  
 2521 gtcccagaa atggaatggg ggtgtggggg tccggctcta ggaacgggt ttggggcggt  
 2581 caggctcttc caaggttggg acccaaggat cggggggccc agcagccccg accgatcgag  
 2641 ccggactctc ggtctctcac tgcctctcct ggcctgccta gttccccag gcccgccacc  
 2701 tctctgtgag agacccggct ctccagccct ccttgcctct accctcagct ccttccacc  
 2761 tgcctggctc ccagtttccc ctctgcccag tcttgcgct gtcccttgac gccctgcac  
 2821 ctctccctcg actcgcagcc ccatcggagc ctctccggg accgcccag gaccagtttc  
 2881 catagactgc ggactggggg ctctctccag cagtactctg atgccccct ccccgacaca  
 2941 gactctcaat ctgcccgtgg taagaacogg ttctgagctg gctctgagc tgcctggggg  
 3001 tgggaagtgg gggctgcccc ctccactct cccatccct cccagcctcc tctccggca  
 3061 ggaactgaac agaaccacaa aaagtctaca tttatttaat atgatggtct ttgcaaaaag  
 3121 gaacaaaaca acacaaaagc ccaccaggct gctgctttgt ggaagacgg tgtgtgtcgt  
 3181 gtgaaggcga aaccgggtgt acataacccc tccccctccg ccccgccccg cccggccccg  
 3241 tagagtcctc gtcgcccgcg ggcctgcct gtagatacgc cccgctgtct gtgctgtgag  
 3301 agtcgcccgt cgtggggggg gaaggggggg acacagctac acgcccatta aagcacagca  
 3361 cgtcctgggg gaggggggga ttttttatgt tacaaaaaa aattacgaaa gaaaagaaat  
 3421 ctctatgcaa atgacgaac atggctctgt ggactcctct ggctgtttt gttggtctct  
 3481 tctctgtaat tccgtgtttt cgttttttcc tccctgcccc tctctccctc tgcctctc  
 3541 tctctctcgc ttctctcccc cctctgtctc gtctctctcc gtctctgtc ctctgtctg  
 3601 tctgtctctg ctcttctctc ccagacctg gccggcgccg cctgtctcgc cctgtctcgc  
 3661 caggctagat ccgaggtggc agctccagcc cccgggctcg cccctcgcg ggcgtgcccc  
 3721 gcgcgccccg ggcggccgaa ggcggggccg cccgctcccg ccccgtagtt gctcttccg  
 3781 tagtggggat gcgcctgca tgtctctca cccgtggatc gtgacgactc gaaataacag  
 3841 aaacaaagtc aataaagtga aaataaataa aaatcctga acaaatccga aaaggcttgg  
 3901 agtctctcgc cagatctctc tcccctgcga gcccttttta tttgagaagg aaaaagagaa  
 3961 aagagaaatc ttaagggaag cccggcgccc agccaggctc cagtggcccg aacggggcgg  
 4021 cgaggggcgc gaggggcgcg aggtccggcc catccagtc ctgtggggct ggccggcgag  
 4081 agaccccgga cccaggccca ggcctaacct gctaaatgtc cccggacggg tctggtctcc  
 4141 tcggccactt tcagtgcgtc ggttcgtttt gattcttttt cttttgtgca cataagaaat

4201 aaataataat aataaataaa gaataaaatt ttgtatgtca aaaaaaaaaa aaaaaaa

**46. SEC ID Nº: 46**

**ttcaccccttgactgtggcacotcccttcagttccgtcgacgaggttgtgcaatccaccagtottataaatac  
agtgaagctccagcctctggaagcctctgtca**

**5 47. SEC ID Nº: 47**

tcaagcgtgactaattg

**48. SEC ID Nº: 48**

ACTGCCATTGCCAAACAC

**49. SEC ID Nº: 49**

10 AAAATCTTGCCAGCTTTCCCC

**50. SEC ID Nº: 50**

GTCGGTTACGGAGCGGACCGGAG

**51. SEC ID Nº: 51**

TAACATATAG ACAAACG CACACCG

15 **52. SEC ID Nº: 52**

GCGCTTGTGTC GCCATTGTATTC

**53. SEC ID Nº: 53**

GTCACACCACAGAAGTAAGTTCC

**54. SEC ID Nº: 54**

20 GTCGGTTACGGAGCGGACCGGAG

**55. SEC ID Nº: 55**

CACAGAGCATTGGCGATCTCGATGC

**56. SEC ID Nº: 56**

ACCCGACTATGTTGCCTGG

25 **57. SEC ID Nº: 57**

AAGCTCTGGATCGAGTCTTTG

**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**

TATGATACCCGGGAGATCGTGATC

**66. SEC ID Nº: 66**

GTGCAGATGCCGGTTCAGGTACTC

45 **67. SEC ID Nº: 67**

TCAGCCCTGGACTACCTGCA

**68. SEC ID Nº: 68**

GAGGTCCCGGTACACCACGT

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> UNIVERSIDAD MÉDICA DE CAROLINA DEL SUR CARLTCN D. DONALD
10	<120> COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS PARA DIAGNOSTICAR, TRATAR Y PREVENIR AFECCIONES DE PRÓSTATA
15	<130> 19113.0129P2
20	<150> 60/885.142 <151> 16-01-2007
25	<160>68
30	<170> Fast SEQ para Windows Versión 4. 0
35	<210>1 <211>5 <212>ADN <213> Secuencia artificial
40	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
45	<400> 1 cct t g 5
50	<210>2 <211> 21 <212>ARN <213> Secuencia artificial
55	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
60	<400> 2 auagacucga cuugacuucu u 21
65	<210>3 <211>21 <212>ARN <213> Secuencia artificial
70	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
75	<400> 3 gaggaaacgu gaugaagauu u 21
80	<210>4 <211> 21 <212>ARN <213> Secuencia artificial
85	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética
90	<400> 4 aucuucacga cguuuccucu u 21
95	<210>5 <211>21 <212>ARN <213> Secuencia artificial

	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética		
5	<400> 5 ggacaagauu gcugaauacu u	21	
	<210>6 <211>21 <212>ARN <213> Secuencia artificial		
10			
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética		
15	<400> 6 guauucagca aucuuguccu u	21	
	<210>7 <211>21 <212>ARN <213> Secuencia artificial		
20			
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética		
25	<400> 7 caucagagca caucaaaucu u	21	
	<210>8 <211>21 <212>ARN <213> Secuencia artificial		
30			
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética		
35	<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		
50	<400> 9 ctccctcag ttcgctgac	20	
	<210> 10 <211> 20 <212>ADN <213> Secuencia artificial		
55			
	<220>		
	<223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética		
60	<400> 10 ct ccct t cac ct t ggt cgac	20	
	<210>11 <211> 20 <212>ADN		
65			

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética	
	<400> 11	
	ct ccct t cac t ct ggt cgac	20
10	<210> 12	
	<211> 40	
	<212>ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<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	
30	act gt ggcac ct ccct t cac ct t ggt cgac gaggt t gt gc	40
	<210> 14	
	<211> 40	
	<212>ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética	
	<400>14	
40	act gt ggcac ct ccct t cac t ct ggt cgac gaggt t gt gc	40
	<210> 15	
	<211>21	
	<212>ARN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética	
50	<400>15	
	gaagucaagu cgagucuaau 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 caaattccat ggca	24
	<210> 17	
65	<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  
 gacacctgag ctgacctgg 20

30 <210>20  
 <211> 24  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética

<400> 20  
 t ct agacggc aggt caggt c aacc 24

40 <210> 21  
 <211>20  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética

50 <400> 21  
 gccct ccct c caaaggagac 20

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

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

<400> 22  
 cgt t cagt cc at cccat 11 c tg 22

60 <210>23

65

# ES 2 390 083 T3

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

# ES 2 390 083 T3

5 <210>29  
 <211> 40  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética  
 10 <400> 29  
 gt t agegat t agaagt t cac get ct act gt ggcacct ccc 40  
 <210>30  
 <211>18  
 <212>ADN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética  
 20 <400> 30  
 cctggcaccc agcacaat 18  
 <210> 31  
 <211> 32  
 25 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética  
 30 <400> 31  
 gt t gcct gcc agt cgccat g agaact t cct ac 32  
 <210>32  
 <211> 20  
 35 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética  
 40 <400> 32  
 gccgat ccac acggagt act 20  
 <210>33  
 <211> 32  
 45 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética  
 50 <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	Oys	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	Oys	Asp	Ile	Ser	Arg	Gln	Leu	Arg	Val	Ser	His	Gly	Oys	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	Oys	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>

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

10

<220>

<221> mi sc\_feature

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

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

15

<400> 35

```

t t c c c c c t t t c c a n g a g g g c c t a a t c c g t t g c g c g c g c g c a c g c g g a c a c a c a c a c a c 60
a c a c a c a c a c a c a c a c a c a c a c a c g g c c c c a t a g c c a c c g c a a c t c t c a g c a g c a g n 120
n c c t a g c t c c t c t g a c c c g a g g c c c c a a g a c g g c g g g c a c a g g a a c c c c t g g g a c g t c c t 180
g g c t c c a g g c t g g a c g t a g g c g g a g g t g g c a g g a g t g g a c a a a c c c a g g c g g g t c c c a c g 240
a c g c c c c t t t c c t c g g g t c t c t c c t t g t t t c a g c c a g c c g c t c t c g c c c c t g g t c c c c t c 300
t t c c c t g c g t t a g g g t c c t t t g t c t c c a g c c a c c t c g c a g c c t g t c c c c g c c t c g g c g g c 360
c c t g c c c t t t g g g c c t c c c a g a t c t c t c t g g c g g g t c c c c t g c c t t a c c a g c t c c c g g c 420
t g t g g c g c g c t c t t c g c c t g c t c c t c a c a t n c a c a c a g c t g c t g g g a g a g g a g g a a g g a a 480
a g g c g g n c g c g c c g c g g a t g a t c c g a g a c g g t a g a t t t g g t g c c g g c t c g c a a a c t c t g 540
g g a a a c t t a a n g c c g g t t c t t c g c c c c t c t n c a a c t a t g n c c a g c g c g g c c c g g t c g c g 600
c g c g t c a c c c g c g g g g a c c c t t t c c t t t t c c t g t a t t t c g g c t g c g g c t g t t t c g c t t 660
c c t c t g g t c t c c c a g c c t t t g g a g t g g c t t c c c t g g c c c t g c a c t c c g t t c c c t t t c g g c 720
c g c c c c c g g c t g t c g c c t g c c c c c a c c c t c c g c a g g t c c c a c g g t c g c g g c g g c g a t g a c 780
t g t g g a g g t a a c g c c g g g g a c g t c c t g g g t c a g c c t g c a c c g t c t c c c t c g a c c a c a g c c 840
c g a t g a g g c c g c g g g c t c g g g c c g g c c g g c t g c t a a g a g a g t t a a t c a t t a c t t c g c c a g c g a 900
c a c t c a g c c t c c c c t t c c g a c t c t c t c g c c c g g c c t a g g g g a g g a g g g g a g g g a c a g c t 960
g g c c a g g t g g g g a c t t c g g c t t c g c a c a a a c c a g c c t c t t c a g g c c t c c c a g a g a c a g g t 1020
g g t g g c t t c t c a g t t c c c t c g g c a a c t c t c t a a g g t c c t c t t t c t t c c c c t c c t g t c t c t 1080
c c c t c c t t c g a g c c t c c t c c c a g c c g c c t c t c c c c a c c g t c t c c t g t c c g c t c t g g c t 1140
t t g a c t g a t t a a c t g c a g g t c c t g g g a g a a c c a a c t t t c t t t g t t t g g a a c c g g a c c g g a 1200
c g g g a t t t c c t t c c c t a g g t c t c c g c c a a t g g g c c a g c t c c t c c c g a c g g t t t t t g g c g g a 1260
c t g g c t g a a g a g g a c c g c g c t g a g g c c a c a a t t a a c c c g g c t g t t g g t g g t g g t g g t g 1320

```

[illegible]

```

agt gccaaag agaact gcgg aggc t ccggc agga t gggg acgt cccgt ggt t gcgcct 5520
cct gcgct cg ccccgat cc accgagct ag cagcgggcgg cgct cagccg cgt ccgcagc 5580
ct cct ct t ct cccagccgg ggagagccag cct cgt ct cc cacat cct ct gccgccagcg 5640
acct gcagct ccgact gt t tccct cccct gt accccct t cccagt cacc cgagggt t ca 5700
gaaaccaagt ccccggt c t cccgccat c cgct ggg t cc caccgaggca ggt ggg t act 5760
cgccggaggi ct t cagct cg at t ct gaacc aagcgt t ct g gact gccag acccggt ggg 5820
caaggggact ggggaggccc t gcgcacagt cgct ggaac gggaggggac aagacaaact 5880
gct ggacact t t t ccgt gga at gagaagt g ggggggt gcgt ggg t gggag gi acct ccgg 5940
agggaaaggc caaagggaag gaccagaaag agaggaagga agagccggga aggaacggaa 6000
gggaact cag agccgaggggt ggt ggggt t g gggct aggga t gcgcact gg gcccggggcc 6060
gcgcggccca ggccggcact ggccagt gga t ggcagggt gggcgagt t a gaact gagag 6120
cccggt t ca cagcgagcg cgct ccgagg cct ct gt cg t t acct gaal at t cat t aga 6180
ct gaccgt c t t t at cct t a t ct aacgt t t at ct t at cgg cgagt t t cgt t t ct cagt gt 6240
agt t t t aat c ccgggt ccc at t cccct c ccccggt ccg ct cccct ccc t cct ct t cc 6300
t t cgccggt gct cct ccc t cct cct c ccat t t ct cc ct cccct gcc ct cccct t gc 6360
cggcaccgga gt gacaggct cggggccct c ct cgccgaag ct cggggct c cagcgt gcc 6420
gaat cacaga gt ggt ggaat ct at t gct t t gt ct gacaa gt cat ccat c t cccggcgcg 6480
gggaggggga ggaggt ct gg agggggct t t gcagt t t t a gagagacaca caccgggagc 6540
cgaggct cca gt ct ccggcc gagt ct t ct a gcagccgcaa cccacct ggg gccagcccag 6600
agct gccagc gccgt cggc t cct cct c cct cccggcc ct t cggccgc gccggcggt gc 6660
gcct gcct t t t cggggggcg ggggct gcc ccgcgcgt c cct cccgca ggcgccacct 6720
cggacat ccc cgggat t gct act t ct ct gc caact t cgc aact cgcag cact t ggaga 6780
ggcccggt c cct cccggc gccct ct gac cgccccgcc cgcgcgt c t ccgaccacc 6840
gcct ct cggga t gaacagg t ccaggggagc t gaggagct c gcct ccccg cccagct t ca 6900
gccct ggct g cagct gcagc gcgagccat g cgccccagt gcaccccgcc ccggcccacc 6960
gccccggggc cal t ct gct g accgcccagc cccgagcccc gacagt ggca agt t gcggct 7020
act gcgg t g caagct ccgg ccaaccgga ggagcccag cggggagcgc agt gt t gcgc 7080
ccccgcccc cgcgcgcc gcagcagcg ggcgt t cact cat cct cct cccccaccgt 7140
cct cct t t t ct cct caag t cct gaagt t gagt t t gaga ggcgacacgg cggcgggcggc 7200
cgcgct gct c ccgct cct ct gcct cccat ggat at gcac t gcaaagcag acccct t ct c 7260
cgcgat gcac cgt gagt acc cgcgcccggc t cct gt cccg gct cgggt c t ccgt cccaa 7320
ccct gt ccag t 7331

```

&lt;210&gt;36

&lt;211&gt; 416

5 &lt;212&gt;PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

10 &lt;223&gt; Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética

&lt;400&gt; 36

Met 1 Asp Met His Oys 5 Lys Ala Asp Pro Phe Ser Ala Met His Pro Gly  
 His Gly Gly Val 20 Asn Gln Leu Gly Gly 25 Val Phe Val Asn Gly 30 Arg Pro  
 Leu Pro Asp 35 Val Val Arg Gln Arg 40 Ile Val Glu Leu Ala 45 His Gln Gly  
 Val Arg 50 Pro Oys Asp Ile Ser 55 Arg Gln Leu Arg Val 60 Ser His Gly Oys  
 Val Ser Lys Ile Leu Gly 70 Arg Tyr Tyr Glu Thr Gly Ser Ile Lys Pro  
 65 Gly Val Ile Gly 85 Ser Lys Pro Lys Val Ala Thr Pro Lys Val Val  
 Asp Lys Ile Ala 100 Glu Tyr Lys Arg Gln 105 Asn Pro Thr Met Phe 110 Ala Trp  
 Glu Ile Arg Asp Arg Leu Leu Ala 120 Glu Gly Ile Oys Asp Asn Asp Thr  
 115 Val Pro Ser Val Ser Ser Ile Asn Arg Ile Ile Arg Thr Lys Val Gln  
 130 Gln Pro Phe His Pro Thr Pro Asp Gly Ala Gly Thr Gly Val Thr Ala  
 145 Pro Gly His Thr Ile 150 Val Pro Ser Thr Ala Ser Pro Pro Val Ser Ser  
 165 Ala Ser Asn Asp 180 Pro Val Gly Ser Tyr 185 Ser Ile Asn Gly Ile 190 Leu Gly

Ile Pro Arg Ser Asn Gly Glu Lys Arg Lys Arg Asp Glu Val Glu Val  
 195 Tyr Thr Asp Pro Ala His Ile 215 Arg Gly Gly Gly 220 Leu His Leu Val  
 210 Trp Thr Leu Arg Asp Val Ser Glu Gly Ser Val Pro Asn Gly Asp Ser  
 225 Gln Ser Gly Val Asp 230 Ser Leu Arg Lys His Leu Arg Ala Asp Thr Phe  
 245 Thr Gln Gln Gln 260 Leu Glu Ala Leu Asp 265 Arg Val Phe Glu Arg 270 Pro Ser  
 Tyr Pro Asp Val Phe Gln Ala Ser Glu His Ile Lys Ser Gu Gln Gly  
 275 Asn Glu Tyr Ser Leu Pro Ala 295 Leu Thr Pro Gly Leu Asp Glu Val Lys  
 290 Ser Ser Leu Ser Ala Ser Thr Asn Pro Glu Leu Gly Ser Asn Val Ser  
 305 Gly Thr Gln Thr Tyr 310 Pro Val Val Thr Gly Arg Asp Met Ala Ser Thr  
 325 Thr Leu Pro Gly Tyr Pro Pro His Val 345 Pro Pro Thr Gly Gln Gly Ser  
 340 Tyr Pro Thr Ser Thr Leu Ala Gly Met Val Pro Gly Ser Gu Phe Ser  
 355 Gly Asn Pro Tyr Ser His Pro Gln Tyr Thr Ala Tyr Asn Glu Ala Trp  
 370 Arg Phe Ser Asn Pro Ala 390 Leu Leu Ser Ser Pro Tyr Tyr Tyr Ser Ala  
 385 Ala Pro Arg Ser Ala 405 Pro Ala Ala Ala Ala 410 Ala Ala Tyr Asp Arg His  
 415

<210> 37  
 <211> 4276  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 37



```

aggct ccagt ct ccggccga gt ct t ct cgc agccgcaacc cacct ggggc cagcccagag 60
ct gccagegc cgt cggct c cct cct ccc t ccggccct t cggccgcg cggcgt gcgc 120
ct gcc t t t c cgggggcgg ggct ggccc gcgcgt ccc ct ccgcagg cgcacct cg 180
gacat ccccg ggt t gct ac t t ct ct gcc aat t cgccaa ct cggcagca ct t ggagagg 240
cccggct ccc ct ccgggcgc cct ct gaccg ccccgcccc gcgcgt ct c cgaccaccgc 300
ct ct cggat g accaggt t cc aggggagct g agcaggt cgc ct ccccgcc cagct t cagc 360
cct ggt gca gct gcagcgc gagccat gcg ccccgagt gc acccggccc ggcccaccgc 420
ccgggggcca t t ct gct gac cgcccagccc cgagccccga cagt ggcaag t t gcggct ac 480
t gcagt t gca agct ccggcc aaccggagg agccccagc gggagcgcag t gt t gcgccc 540
cccgcccccg cgcgccccgc agcagccggg cgt t cact ca t cct cct cc cccaccgt cc 600
ct cct t t t c t cct caagt c ct gaagt t ga gt t t gagagg cgacacggcg gcggcgcccg 660
cgct gct ccc gct cct ct gc ct cccat gg at at gcact g caaagcagac cct t ct ccg 720
cgal gcaccc agggcacggg ggt gt gaacc agct cggggg ggt gt t t gt g aacggccggc 780
ccct acccga cgt ggt gagg cagcgc at cg t ggagct ggc ccaccagggt gt gcggccct 840
gt gacat ct c ccggcagct g cgggt cagcc acggt gt gt cagcaaaat c ct gggcaggt 900
act acgagac cggcagcat c aagccgggt g t gal cgggt gg ct ccaagccc aaagt ggcga 960
cgcccaaagt ggt ggacaag at t gct gaat acaaacgaca gaaccgact at gt t cgcct 1020
gggagat t cg agaccggct c ct ggccgagg gcat ct gt ga caat gacaca gt gccagcg 1080
t ct ct t ccat caacagaat c at ccggacca aagt t cagca gcct t t ccac ccaacgccgg 1140
at ggggt gg gacaggagt g accgcccc g gccacacct t gt t cccagc acggcct ccc 1200
ct cct gt t t c cagcgcct cc aat gaccag t gggat cct a ct ccat caat gggat cct gg 1260
ggat t cct cg ct ccaat ggt gagaagagga aacgt gat ga agt t gaggt a t acact gat c 1320
ct gccacat t agaggaggt ggaggt t t gc at ct ggt ct g gact t t aaga gat gt gt ct g 1380
agggct cagt ccccaat gga gat t cccaga gt ggt gt gga cagt t t gcgg aagcact t gc 1440
gagct gacac ct t caccag cagcagct gg aagct t t gga t cgggt ct t t gagcgt cct t 1500
cct accct ga cgt ct t ccag gcat cagagc acat caaat c agaacagggg aacgagt act 1560
ccct cccagc cct gacccct gggct t gat g aagt caagt c gagi ct at ct gcat ccacca 1620
acct gagct gggcagcaac gt gt caggca cacagacat a cccagt t gt g act ggt cgt g 1680
acat ggcgag caccact ct g cct ggt t acc cccct cagct gccccccact ggccagggaa 1740

```

```

gct accccac ct ccaccct g gcaggaat gg t gcct gggag cgagt t ct cc ggcaaccct 1800
acagccaccc ccagt acacg gcci acaacg aggt t ggag at t cagcaac cccgct t ac 1860
t aagt t cccc t t at t at t at agt gccgcc cccgt ccgc cct gccgt g gct gccgt g 1920
cct al gaccg ccact agt t a ccgcggggac cacat caagc t t caggccga cagct t cggc 1980
ct ccacat cg t cccgt ct g accccacccc ggagggaggg aggaccgacg cgacgcgat g 2040
cct cccggcc accgccccag cct caccacca t cccacgacc cccgcaacc t t cacat cac 2100
ccccct cgaa ggt cggacag gacgggt gga gccgt gggcg ggacct cag gcccgggccc 2160
gccgccccca gccccgct g ccgcccct cc ccgct gcci ggact gcgcg gcgccgt gag 2220
ggggat t cgg cccagct cgt cccggcct cc accaagccag cccgaagcc cgccagccac 2280
cct gccggac t cgggcgcga cct gct ggcg ccgcccggat gt t t ct gi ga cacacaat ca 2340
gcgcgggaccg cagcgcggcc cagccccggg caccgcct c ggacgt cgg gcgccaggag 2400
gct t cgt gg aggggt ggg ccaaggagat t aagaagaaa acgact t t ct gcaggaggaa 2460
gagccccgt g ccgaat ccti gggaaaaat t ct t t cccc agt gccagcc ggact gccct 2520
cgct t cgg gt gt gccct g t cccagaaga t ggaat gggg gt gt ggggt cgggt ct ag 2580
gaacgggt t t gggggcgt c aggt ct t t cc aaggt t gggg cccaaggat c gggggggccc 2640
gcagccccga ccgat cgagc cggact ct cg gct ct t cact gct cct cct g gccgt ag 2700
t t cccaggg cccggcacct cct gct gcga gaccgggt c t cagccct gc ct t gccct a 2760
cct cagcgt c t t t ccact gct ggct cc cagt t t cccc t cct gccgt cct t cggct 2820
t cct t gacg cct geat cc t cct cct ga ct cgcagcc cat cggacgc t ct cccggga 2880
ccgcgcgagg accagt t t cc at agact gcg gact ggggt c t t cct ccagc agt t act t ga 2940
t gccccct cc cccgacacag act ct caat c t gccgt ggt aagaaccgt t ct gagct gg 3000
cgt ct gagct gct gcgggt ggaagt gggg ggct gccac t cact cct c ccat cccct c 3060
ccagcct cct cct ccggcag gaact gaaca gaaccacaaa aagt ct acat t t at t t aat a 3120
t gat ggt ct t t gcaaaaagg caccaggt g cct gct t t gt g gact cct ct g 3180
gaaagacggt gt gt gt cgt g t gaaggcgaa acccgt gt a cat aacccct cccct ccgc 3240
cccgccccgc ccggccccgt agagt cct g t cgcgcgcg gccct gcct g t agat acgc 3300
ccgct gt ct g t gct gt gaga gt cgccgt c gct gggggg aaggggggga cacagct aca 3360
cgcccat t aa agcacagcac gt cct ggggg agggggggcat t t t t t at gt t acaaaaaaaa 3420
at t acgaaag aaaagaaat c t ct at gcaaa at gacgaaca t ggt cct gt g gact cct ct g 3480
gccgt gt t t t g t t ggt ct t t ct ct ct gt aat t ccgt gt t t t c gct t t t cct cct gccct 3540
ct ct cct ct gccct ct ct cct ct ccgt t ct ct cccc t ct gt ct ct g t ct ct ct ccg 3600
t ct ct gt cgc t ct t gt ct gt ct gt ct ct gc t ct t t cct cg gccct ct ct cc ccagacct gg 3660
cccgccgcgc ct gt ct ccgc aggt agat c cgaggt ggca gct ccagccc ccgggt cgc 3720
cccc cgcgg gegt gcccg ccgcgcccg gccggccgaag gccgggcgc cccgt cccgc 3780
cccggt agt t g ct ct t t cgggt agt ggcgat g cgcct gcat gt ct cct cac ccgt 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 gt cct cgcgc agat ct ct ct cccct gcgag cct t t t at 3960
t t gagaagga aaaagagaaa agagaat cgt t t aagggaac ccggcgcccc gccaggct cc 4020
agt ggcgcga acggggcggc gagggcggcg agggcgccga ggt cggccc at cccagt cc 4080
t gt ggggt g gccgggcaga gaccccgac ccaggcccag gcc aacct g ct aaat gt cc 4140
ccggacggt t ct ggt ct cct cggccact t t cagt gcgt cg gt t cgt t t t g at t ct t t t c 4200
t t t t gt gcac at aagaaat a aat aat aat a at aaat aaag aat aaaat t t t gi at gt caa 4260
aaaaaaaaa aaaaaa 4276

```

<210> 38

<211> 393

<212>PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

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

<400> 38

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

&lt;210&gt;39

&lt;211&gt;4207

5 &lt;212&gt;ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética

10

&lt;400&gt; 39

```

aggct ccagt  ct ccggccga  gt ct t ct cgc  agccgcaacc  cacct ggggc  cagcccagag  60
ct gccagcgc  cgt cggct c  cct cct ccc  t cccggccct  t cggccgcgg  cggcgt gcgc  120
ct gcc t t t c  cgggggcggg  ggct ggcc  gcgcgt ccc  ct cccgcagg  cgccacct cg  180
gacat ccccg  gga t gct ac  t t ct ct gcca  act t cgccaa  ct cgcagca  ct t ggagagg  240
cccggct ccc  ct cccggcgc  cct ct gaccg  ccccgcccc  gcgcgt ct c  cgaccaccgc  300
ct ct cggat g  accagg t cc  aggggagct g  agcag t cgc  ct ccccgcc  cagct t cagc  360
cct ggt gca  gct gcagcgc  gagecat gcg  cccccagt gc  accccggccc  ggcccaccgc  420
cccggggcca  t t ct gct gac  cgcccagccc  cgagccccga  cagt ggcaag  t t gcggct ac  480
t gcag t gca  agct ccggcc  aaccggagg  agccccagcg  gggagcgcag  t gt t gcgcc  540
cccgcccccg  cgcgccccgc  agcagccggg  cgt t cact ca  t cct cct cc  cccaccgt cc  600
ct cct t t t c  t cct caagt c  ct gaagt t ga  gt t t gagagg  cgacacggcg  gcggcggccg  660
cgct gct ccc  gct cct ct gc  ct ccccat gg  at at gcact g  caaagcagac  cct t ct ccg  720
cgat gcacc  agggcacggg  ggt gt gaacc  agct cggggg  ggt gt t t gt g  aacggccggc  780
cct accga  cgt ggt gagg  cagcgc at cg  t ggagct ggc  ccaccagggt  gt gcggccct  840
gt gacat ct c  ccggcagct g  cgggt cagcc  acggct gt gt  cagcaaaat c  ct gggcaggt  900
act acgagac  cggcagcat c  aagccgggt g  t gat cgt gg  ct ccaagccc  aaagt ggca  960
cgcccaaagt  ggt ggacaag  at t gct gaat  acaaacgaca  gaaccgact  at gt t cgct  1020
gggagat t cg  agaccggct c  ct ggccgagg  gcat ct gt ga  caat gacaca  gt gccagcg  1080
t ct ct t ccat  caacagaat c  at ccggacca  aagt t cagca  gcct t t ccac  ccaacgccgg  1140
at ggggt gg  gacaggagt g  accgcccc t g  gccacacat  t gt t cccagc  acggcct ccc  1200
ct cct gt t t c  cagcgct cc  aat gaccag  t gggat cct a  ct ccat caat  gggat cct gg  1260
ggat t cct cg  ct ccaat ggt  gagaagagga  aacgt gat ga  agat gt gt ct  gagggt cag  1320

```

tccccaatgg	agatccccag	agtggtgtgg	acagtttgcg	gaagcacttg	cgagctgaca	1380
ccitcaccca	gcagcagctg	gaagctttgg	atcggtctt	tgagcgtcc	tcciaccttg	1440
acgtcttcca	ggcatcagag	cacatcaaat	cagaacaggg	gaacgagtag	tccctcccag	1500
ccctgacccc	tgggttgat	gaagtcaagt	cgagctatc	tgcacccacc	aacctgagc	1560
tgggcagcaa	cgtgtcaggc	acacagacat	accagttgt	gactggtcgt	gacatggcga	1620
gcaccactct	gcctggttac	ccccctcagc	tcccccccac	tggccaggga	agctacccca	1680
ccctccacct	ggcaggaatg	gtgcctggga	gcgagttctc	cggcaacccg	tacagccacc	1740
cccagtagac	ggcctacaac	gaggtctgga	gatlcagcaa	ccccgcctta	ctaatgtccc	1800
cttattattt	tagtgcgcgc	ccccggtccg	ccctgcgcgc	tgtgcgcgt	gcctatgacc	1860
gccactagtt	accgcgggga	ccacatcaag	cttcaggccg	acagcttcgg	ccctccacatc	1920
gtccccgtct	gacccaccac	cggaggggagg	gaggaccgac	gcgacgcgat	gcctccgggc	1980
caccgccccca	gcctcaccac	atcccacgac	ccccgcaacc	cttcacatca	ccccctcga	2040
aggtcggaca	ggacgggtgg	agcgtgggc	gggacctca	ggcccgggcc	cgccgcccc	2100
agccccgcct	ggcgcacctc	ccccgctgcc	tggactgcgc	ggcgccgtga	gggggattcg	2160
gccagctcgt	tccccgcctc	caccaagcca	gccccgaagc	cgccgaccca	ccctgccgga	2220
ctcgggcgcg	acctgctggc	gcgcgcgcga	tgtttctgtg	acacacaatc	agcgcggacc	2280
gcagcgcggc	ccagccccgg	gcaccgcctt	cggacgtcgt	ggcgccagga	ggcttcgctg	2340
gagggggtcg	gccaaggaga	ttaaagaaga	aacgactttc	tgcaggagga	agagcccgct	2400
gcggaatccc	tgggaaaaat	tcttttcccc	cagtgccagc	cggactgccc	tgccttcceg	2460
ggtgtgcctt	gtcccagaag	atggaatggg	gggtgtgggg	tgcggtctca	ggaaagggtt	2520
ttgggggctg	caggtctttc	caaggttggg	acccaaggat	cggggggccc	agcagcccg	2580
accgatcgag	ccggactctc	ggctcttcac	tgtctctct	ggctgcctca	gttccccagg	2640
gcccggcacc	tctgtctggc	agccccggtt	ctcagccctg	ccctgccct	acctcagcgt	2700
ctcttccacc	tgtggctcgc	ccagtctccc	ctcctgccag	tcttgcgtt	gtcccttgac	2760
gcccctgcac	ctccctccctg	actcgcagcc	ccatcggacg	ctctccggg	accgcccag	2820
gaccagtttc	catagactgc	ggactgggtt	cttccctccag	cagttacttg	atgccccctc	2880
cccgcacaca	gactctcaat	ctgccggtgg	taagaaccgg	ttctgagctg	gcgtctgagc	2940
tgtcgcgggg	tggaagtggg	gggtcgccta	ctccactcct	cccatcccc	cccagctccc	3000
tctcgcggca	ggaactgaac	agaaccacaa	aaagtctaca	tttttttaat	atgagtgtct	3060
ttgcaaaaag	gaacaaaaaca	acacaaaaagc	ccaccaggct	gtgtctttgt	ggaaagacgg	3120
tgtgtgtcgt	gtgaaggcga	aaccgggtgt	acataacccc	tccccctcgg	ccccgccccg	3180
cccgcccccg	tagagtcctt	gtcgcccgcc	ggccctgcct	gtagatcgc	cccgctgtct	3240
gtgctgtgag	agtccgcgct	cgttgggggg	gaaggggggg	acacagctac	acgcccattc	3300
aagcacagaca	cgtcctgggg	gaggggggca	ttttttatgt	tacaaaaaaa	aatlacgaaa	3360
gaaaagaaat	ctctatgcac	aatgacgaac	atggtcctgt	ggactcctct	ggcctgtttt	3420
gttggctctt	tctctgtaat	tccgtgtttt	cgctttttcc	tccctgcccc	tctctccctc	3480
tggccctctc	tccctccgcg	ttctctcccc	ctctgtctct	gtctctctcc	gtctctgtcg	3540
ctcttgtctg	tctgtctctg	ctctttctct	ggcctctctc	cccagacctg	gccccggcgc	3600
ccctgtctcgg	caggctagat	ccgaggtggc	agctccagcc	cccggtctcg	ccccctcgcg	3660
ggcgtgcccc	gcgcgccccg	ggcgcccgaa	ggccggggcg	ccccgtcccg	ccccgtagtt	3720
gctctttcgg	tagtggcgtt	gcgccctgca	tgtctcctca	cccggtgatc	gtgacgactc	3780
gaaat aacag	aaacaaagt	aat aaagtga	aaat aaat aa	aaat ccttga	acaaatccga	3840
aaaggcttgg	agt cctcgcc	cagatctctc	tccccgcga	gcccccttca	tttgagaagg	3900
aaaaagagaa	aagagaatcg	tttaagggaa	cccgccgccc	agccaggctc	cagtgccccg	3960
aacggggcgg	cgagggcggc	gagggcgccg	aggtccggcc	catcccagtc	ctgtggggct	4020
ggccgggcag	agaccccgga	cccaggccca	ggcctaacct	gctaaatgtc	cccgagcggt	4080
tctgtctccc	tcgccacttt	tcagtgcttc	ggttcgtttt	gattcttttt	cttttgtgca	4140
cat aagaat	aaat aat aat	aat aat aaa	gaat aaaaat	ttgtatgtca	aaaaaaaaaa	4200
aaaaaaaaaa						4207

<210>40  
<211> 396  
<212>PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética  
<400> 40

Met Asp Met His Cys Lys Ala Asp Pro Phe Ser Ala Met His Pro Gly  
 1 His Gly Gly Val Asn Gln Leu Gly Gly Val Phe Val Asn Gly Arg Pro  
 20 Leu Pro Asp Val Val Arg Gln Arg Ile Val Glu Leu Ala His Gln Gly  
 35 Val Arg Pro Cys Asp Ile Ser Arg Gln Leu Arg Val His Gly Cys  
 50 Val Ser Lys Ile Leu Gly Arg Tyr Tyr Glu Thr Gly Ser Ile Lys Pro

65 Gly Val Ile Gly Gly 70 Ser Lys Pro Lys Val 75 Ala Thr Pro Lys Val 80 Val  
 85 Asp Lys Ile Ala Glu Tyr Lys Arg Gln Asn 90 Pro Thr Met Phe 95 Val Trp  
 100 Glu Ile Arg Asp Arg Leu Leu Ala Glu Gly Ile Cys Asp Asn Asp Thr  
 115 Val Pro Ser Val Ser Ser Ile Asn Arg Ile Ile Arg Thr Lys Val Gln  
 130 Gln Pro Phe His Pro Thr Pro Asp Gly Ala Gly Thr Gly Val Thr Ala  
 145 Pro Gly His Thr Ile Val Pro Ser Thr Ala Ser Pro Pro Val Ser Ser  
 165 Ala Ser Asn Asp Pro Val Gly Ser Tyr Ser Ile Asn Gly Ile Leu Gly  
 180 Ile Pro Arg Ser Asn Gly Glu Lys Arg Lys Arg Asp Glu Asp Val Ser  
 195 Glu Gly Ser Val Pro Asn Gly Asp Ser Gln Ser Gly Val Asp Ser Leu  
 210 Arg Lys His Leu Arg Ala Asp Thr Phe Thr Gln Gln Gln Leu Glu Ala  
 225 Leu Asp Arg Val Phe Glu Arg Pro Ser Tyr Pro Asp Val Phe Gln Ala  
 245 Ser Glu His Ile Lys Ser Glu Gln Gly Asn Glu Tyr Ser Leu Pro Ala  
 260 Leu Thr Pro Gly Leu Asp Glu Val Lys Ser Ser Leu Ser Ala Ser Thr  
 275 Asn Pro Glu Leu Gly Ser Asn Val Ser Gly Thr Gln Thr Tyr Pro Val  
 290 Val Thr Gly Arg Asp Met Ala Ser Thr Thr Leu Pro Gly Tyr Pro Pro  
 305 His Val Pro Pro Thr Gly Gln Gly Ser Tyr Pro Thr Ser Thr Leu Ala  
 325 Gly Met Val Pro Glu Ala Ala Val Gly Pro Ser Ser Ser Leu Met Ser  
 340 Lys Pro Gly Arg Lys Leu Ala Glu Val Pro Pro Cys Val Gln Pro Thr  
 355 Gly Ala Ser Ser Pro Ala Thr Arg Thr Ala Thr Pro Ser Thr Arg Pro  
 370 Thr Thr Arg Leu Gly Asp 390 Ser Ala Thr Pro Pro Tyr  
 385 395

<210> 41  
 <211> 4290  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 41

```

aggct ccagt ct ccggccga gt ct t ct cgc agccgcaacc cacct ggggc cagcccagag 60
ct gccagcgc cgt cggt c cct cct ccc t ccggccct t cgcccgcg cggcgt ggc 120
ct gcc t t t c cgggggcggg ggct ggccc gcgcgt ccc ct ccgcagg cgccacct cg 180
gacat cccg ggat t gct ac t t ct ct gcca act t cgccaa ct cgccagca ct t ggagagg 240
cccggt ccc ct ccgggcgc cct ct gaccg ccccgcccc gcgcgt ct c cgaccaccgc 300
ct ct cgga g accagg t cc aggggagct g agcgagt cgc ct ccccgcc cagct t cagc 360
cct ggt gca gct gcagcgc gagcat gcg ccccgagt gc acccgggcc ggcccaccgc 420
cccggggcca t t ct gct gac cgcccagccc cgagccccga cagt ggcaag t t gcggct ac 480
t gcagt t gca agct ccggcc aaccggagg agccccagcg gggagcgag t gt t gcgccc 540
cccgcccccg cgcgccccgc agcagccggg cgt t cact ca t cct cct cc cccaccgt cc 600
ct cct t t t c t cct caagt c ct gaagt t ga gt t t gagagg cgacacggcg gcggcgggcg 660
cgct gct ccc gct cct ct gc ct ccccal gg at at gcact g caaagcagac cct t t ct ccg 720
cgat gcacc agggcacggg ggt gt gaacc agct cggggg ggt gt t t gt g aacggccggc 780
cct accga cgt ggt gagg cagcgcat cg t ggagct ggc ccaccagggt gt gcggccct 840
gt gacat ct c ccggcagct g cgggt cagcc acggct gt gt cagcaaat c ct gggcaggt 900
act acgagac cggcagcat c aagccgggt g t gat cgtt gg ct ccaagccc aaagt ggcga 960

```

cgcccaaaagt ggt ggacaag at t gct gaat acaaacgaca gaacccgact at gt t cgcct 1020  
 gggagat t cg agaccggct c ct ggccgagg gcat ct gt ga caat gacaca gt gccagcg 1080  
 t ct ct t ccat caacagaat c at ccggacca aagt t cagca gcct t t ccac ccaacgccgg 1140  
 at ggggct gg gacaggagt g accgcccci g gccacacat t gt t ccagc acggcct ccc 1200  
 ct cct gt t t c cagcgccct cc aat gacccag t gggat cct a ct ccat caat gggat cct gg 1260  
 ggal t cct cg ct ccaat ggt gagaagagga aacgt gat ga agat gt gt ct gagggct cag 1320  
 t ccccaat gg agat t ccag agt ggt gt gg acagt t t gcg gaagcact t g cgagct gaca 1380  
 cct t caccca gcagcagct g gaagct t t gg at cgggt ct t t gagcgt cct t cct accct g 1440  
 acgt ct t cca ggcct cagag cacat caaat cagaacaggg gaacgagt ac t cct cccag 1500  
 cct gacccc t gggct t gat gaagt caagt cgagt ct at c t gcat ccac aacct gagg 1560  
 t gggcagcaa cgt gt caggc acacagacat acccgt t gt gact ggt cgt gacat ggcga 1620  
 gcaccact ct gcci ggt t ac cccct cagc t gccccccac t ggccaggga agct acccca 1680  
 cct ccaccc t ggcaggaat g gt gct gagg ct gcagt t gg cccct t gt gt gcaacccact ggagcgagt t 1800  
 gcagccggg gaggaagct t cgcagaagt gc cccct t gt gt caccggcct ac gagat t cag 1860  
 ct ccggcaac ccgt acagcc acccccag t a t t at agt gcc gccccccgt cgcgccct gc 1920  
 caaccccgcc t t act aagt t accgccact a gt t accggg t ct gacccca ccccgagggg agggaggacc 2040  
 cgct gct gcc cggcct ccac at cgt ccccg ggccaccgcc ccagcct cag cccat cccac gacccccgca 2100  
 ccgacagct t gggcct ccac gal gcc ccc cgaaggt cgg acaggacggg t ggagccgt g ggccgggaccc 2160  
 gacgcgacgc ggcgcggcc t gagggggat t cggccccag t cgt cccggc ccccgccct g gcci ggaat g 2220  
 accct t caca t cccccct t gggggggat ggact cgggc ggcacct gct cgggcacccg cct cggacgc 2280  
 t caggccccg gcccgcggcc ccaccc t gcc accgcagcgc ggcccagccc i gggccaagg agat t aagaa gaaaacgact 2340  
 cgccggcgct t gagggggat at cagecggg ct ggagggggc t gggccaagg aat t ct t t c cccaggt gcc 2400  
 agcccgccag ccaccc t gcc gct gccgaat cct g cccag cct gt cccag t t ccaaggt t gggacccaag 2460  
 gt gacacaca ggagggct t cg gct gggggt ggcacccgat c gagccggact ct cggct ct t cact gct cct 2520  
 t cgggcgcca ggaagagccc cgggggt gt gc cct g cccag cgt caggt ct t cgt caggt cct 2580  
 t t ct gcagga ccc t cgcct t gggt cct agt t cccc agggccccggc acct cct gct gcgagacccc gct ct cagcc 2640  
 agccggact g cct cgcct t ggggt cgggct ct aggaacgg cgcacccgat c gagccggact ct cggct ct t cct cct gc 2700  
 ggt cgggct cct agt t cccc cct acct cag cgt ct ct t cc acct gct ggc ct cccag t t cccct cct gc 2760  
 cgt cct t cg cct gt cct t gacgccct gc at cct cct cc ct gact cgca gcccct cgg 2820  
 acgt ct ccc gggaccggc t t ccat agac t cgggact gg ggt ct t cct c ggt ct l cct c 2880  
 cagcagt t ac t t gat gcccc ct cccccgac acagact ct c ggggt ggaagt ggggggct gc cact cact 2940  
 cgg t t ct gag ct ggcgt ct g agct gct gcg ggggt ggaagt ggggggct gc cact cact 3000  
 cct cccat cc cct cccagcc t cct cct ccg gcaggaact g aacagaacca caaaaagt ct 3060  
 acat t t at t t aat at gal gg t ct t t gcaaa aaggaacaaa acaacacaaa ageccaccag 3120  
 gct gct gct t t gt ggaaaga cgggt gt gt gt cgt gt gaagg cgaacccgg t gt acat aac 3180  
 cct cccct cccgccccgcc cggccccggc cct gt cggcc cct gt cgccc gccggccct g 3240  
 cct gt agat a cgccccgt g t ct gt gct gt gagagt cggc gct cgt ggg ggggaagggg 3300  
 gggacacagc t acacgccc t t aaagcaca gcacgt cct g gcacgt cct g ggggaggggg gcat t t t t a 3360  
 t gt t aaaaa aaaaa t acg t t t gt t ggt t t t t ct ct gt ct cct cct cct c 3420  
 t gt ggact cc t ct ggcct gt t t t gt t ggt t t t t ct ct ct c ct ct cct c 3480  
 t cct cct gc cct ct ct c t ct gcccc t ct ct cct ct c ct ct cct ct c ct gct ct t c 3540  
 t ct gt ct ct c t cgt ct t gt ct gt ct gt ct cct cct cct cct cct cct cct c 3600  
 ct ccccagc ct ggcgggc cgcctt gt ct cggcaggt a gat ccgaggt ggcagct cca 3660  
 gcccccgggc t cgcctt c gcggcgct gc cccgcggcc cggggcgcc gaaggccggg 3720  
 ccgccccgt c ccgccccgt a gt t gct ct t t cgg t agt ggc gat gcgccc gcat gt ct cc 3780  
 t cccccgt gg at cgt gacga ct cgaaat aa cagaaacaaa gt caat aaag t gaaaat aaa 3840  
 t aaaaa cct t gaacaaat c cgaaaaggct t ggagt cct c gccagat ct ct ct cccct g 3900  
 cgagccct t t t at t t gaga aggaaaaaga gaaaagagaa t cgt t t aagg gaaccggcg 4020  
 cccagccagg ct ccagt ggc ccgaacgggg cggcgagggc ggcgagggcg ccaggt ccg 4080  
 gcccct ccca gt cct gt ggg gct ggcggg cagagacccc ggacccaggc ccaggcct aa 4140  
 cct gct aat gt cccggac ggt t ct ggt c t cct cggcca ct t t cagt gc gt cgt t cgt 4200  
 t t t gat t ct t t t t ct t t t t gcacat aaga aat aat aat aat aat aat aat 4260  
 at t t t gt at g t caaaaaaa aaaaaaaaaa 4290

<210>42  
 <211> 408  
 <212>PRT  
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 42



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

&lt;210&gt;43

&lt;211&gt; 4188

5

&lt;212&gt;ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética

10

&lt;400&gt; 43

```

aggct ccagt  ct ccggccga  gt ct t ct cgc  agccgcaacc  cacct ggggc  cagcccagag  60
ct gccagegc  cgt cggct c  cct cct ccc  t ccggccct  t cggccgcgg  cggcgt gcgc  120
ct gct t t t c  cgggggcggg  ggct ggcc  gcgcgt ccc  ct ccgcagg  cggcacct cg  180
gacat ccccg  ggat t gct ac  t t ct ct gcc  act t cgccaa  ct cggcagca  ct t ggagagg  240
cccggt ccc  ct ccgggcgc  cct ct gaccg  ccccgcccc  gcgcgt ct c  cgaccaccgc  300
ct ct cggat g  accaggt t cc  aggggagct g  agcgagt cgc  ct ccccgcc  cagct t cagc  360
cct ggct gca  gct gcagcgc  gagccat gcg  ccccgagt gc  acccgggcc  ggcccaccgc  420

```

ccccgggcca	t t c t g c t g a c	cgccccagccc	cgagccccga	cag t ggcaag	t t g c g g c t a c	480
t g a g t t g c a	a g c t c c g g c c	a a c c c g g a g g	a g c c c c a g c g	g g g a g c g c a g	t g t t g c g c c c	540
c c c g c c c c c g	c g c g c c c c g c	a g c a g c c g g g	c g t t c a c t c a	t c c t c c c t c c	c c c a c c g t c c	600
c t c c c t t t t c	t c c t c a a g t c	c t g a a g t t g a	g t t t g a g a g g	c g a c a c g g c g	g c g g c g c c c g	660
c g c t g c t c c c	g c t c c t c f g c	c t c c c a t g g	a t a t g c a c t g	c a a g c a g a c	c c c t t c t c g g	720
c g a t g c a c c c	a g g g c a c g g g	g g t g t g a a c c	a g c t c g g g g g	g g t g t t t g t g	a a c g g c c g g c	780
c c c t a c c c g a	c g t g g t g a g g	c a g c g c a t c g	t g g a g c t g g c	c c a c c a g g g t	g t g c g g c c c t	840
g t g a c a t c f c	c c g g c a g c t g	c g g t c a g c c	a c g g c t g t g t	c a g c a a a a t c	c t g g g c a g g t	900
a c t a c a g a g a c	c g g c a g c a t c	a a g c c g g g t g	t g a t c g g t g g	c t c c a a g c c c	a a a g t g g c g a	960
c g c c c a a a g t	g g t g g c a a g	a t t g c t g a a t	a c a a a c g a c a	g a a c c g c a c t	a t g t t c g c c t	1020
g g g a g a t t c g	a g a c c g g c t c	c t g c c g a g g	g c a t c t g t g a	c a a t g a c a c a	g t g c c c a g c g	1080
t c t c t t c c a t	c a a c a g a a t c	a t c c g g a c c a	a a g t t c a g c a	g c c t t t c c a c	c c a a c g c c g g	1140
a t g g g g c t g g	g a c a g g a g t g	a c c g c c c c t g	g c c a c a c c a t	t g t t c c c a g c	a c g g c c t c c c	1200
c t c c t g t t c g	c a g c g c c t c c	a a t g a c c c a g	t g g a t c c t a	c t c c a t c a a t	g g g a t c c t g g	1260
g g a t t c c t c g	c t c c a a t g g t	g a g a a g a g g a	a a c g t g a t g a	a g a t g t g t c t	g a g g g c t c a g	1320
t c c c c a a t g g	a g a t t c c c a g	a g t g g t g t g g	a c a g t t t g c g	g a a g c a c t t g	c g a g c t g a c a	1380
c c t t c a c c c a	g c a g c a g c t g	g a a g c t t t g g	a t c g g g t c t t	t g a g c g t c c t	t c c t a c c c t g	1440
a c g t c t t c c a	g g c a t c a g a g	c a c a t c a a a t	c a g a a c a g g g	g a a c g a g t a c	t c c c t c c c a g	1500
c c c t g a c c c c	t g g g c t t g a t	g a a g t c a a g t	c g a g t c t a t c	t g c a t c c a c c	a a c c c t g a g c	1560
t g g g c a g c a a	c g t g t g a g g c	a c a c a g a c a t	a c c c a g t t g t	g a c t g g t c g t	g a c a t g g c g a	1620
g c a c c a c t c t	g c c t g g t t a c	c c c c c t c a c g	t g c c c c c c a c	t g c c a g g a g a	a g c t a c c c c a	1680
c c t c c a c c c t	g g c a g g a a t g	g t g c c t g g g a	g c g a g t t c t c	c g g c a a c c c g	t a c a g c c a c c	1740
c c c a g t a c a c	g g c c t a c a a c	g a g g c t t g g a	g a t t c a g c a a	c c c c g c c t t a	c t a a t g c c g c	1800
c c c c c g g t c c	g c c c c t g c c g	c t g c t g c c g c	t g c c t a t g a c	c g c c a c t a g t	t a c c g c g g g g	1860
a c c a c a t g a a	g c t t c a g g c c	c a c a g c t c g	g c c t c c a c a t	c g t c c c c g t c	t g a c c c c a c c	1920
c c g g a g g g a g	g g a g g a g g a g	c g c g a c g c g a	t g c c t c c c g g	c a c c g c c c c	a g c c t c a c c c	1980
c a t c c c a c g a	c c c c c g c a a c	c c t t c a c a t c	a c c c c c c t c g	a a g g t c g g a c	a g g a c g g g t g	2040
g a g c c g t g g g	c g g g a c c c t c	a g g c c c g g g c	c c g c c g c c c c	c a g c c c c g c c	t g c c g c c c c t	2100
c c c c g c c t g c	c t g g a c t g c g	c g g c g c c g t g	a g g g g g a t t c	g g c c c a g t c	g t c c c g g c c t	2160
c c a c c a a g c c	a g c c c c g a a g	c c c g c a c a g c	a c c c t g c c g g	a c t c g g g c g c	g a c c t g c t g g	2220
g g c g c g c c g g	a t g t t c t g t g	g a c a c a c a a t	c a g c g c g g a c	c g a g c g c g g	c c c a g c c c c g	2280
g g c a c c c g c c	t c g g a c g t c	g g g c g c c a g g	a g g c t t c g c t	g g a g g g g c t g	g g c c a a g g a g	2340
a t t a a g a a g a	a a a c g a c t t t	c t g c a g g a g g	a a g a g c c c g c	t g c c g a a t c c	c t g g g a a a a a	2400
t t c t t t t c c c	c c a g t g c c a g	c c g g a c t g c c	c t c g c c t t c c	g g g t g t g c c c	t g t c c c a g a a	2460
g a t g g a a t g g	g g g t g t g g g g	g t c c g g c t c t	a g g a a c g g g c	t t t g g g g g c g	t c a g g t c t t t	2520
c c a a g g t t g g	g a c c a a g g a	t c g g g g g g c c	c a g c a g c c c g	c a c c a t c g a	g c c g g a c t c t	2580
c g g t c t t c a	c t g c t c c t c c	t g c c t g c c c c	a g t t c c c c a g	g c c c c g g c a c	c t c c t g c t g c	2640
g a g a c c c g g c	t c t c a g c c c t	g c c t t g c c c c	t a c c t c a g c g	t c t c t t c c a c	c t g c t g g c c t	2700
c c c a g t t t c c	c c t c c t g c c a	g t c c t t c g c c	t g t c c c t t g a	c g c c c t g c a t	c c t c c t c c c t	2760
g a c t c g c a g c	c c c a t c g g a c	g c t c t c c c g g	g a c c g c c g c a	g g a c c a g t t t	c c a t a g a c t g	2820
c g g a c t g g g g	t c t t c c t c c a	g c a g t t a c t t	g a t g c c c c t	c c c c c g a c a c	a g a c t c t c a a	2880
t c t g c c g g t g	g t a a g a a c g g	g t t t c t g a g t				

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética

5

&lt;400&gt; 44

```

Met Asp Met His Cys Lys Ala Asp Pro Phe Ser Ala Met His Pro Gly
1  5  10  15  20  25  30  35  40  45  50  55  60  65  70  75  80
His Gly Gly Val Asn Gln Leu Gly Gly Val Phe Val Asn Gly Arg Pro
Leu Pro Asp Val Val Arg Gln Arg Ile Val Glu Leu Ala His Gln Gly
Val Arg Pro Cys Asp Ile Ser Arg Gln Leu Arg Val Ser His Gly Cys
Val Ser Lys Ile Leu Gly Tyr Tyr Glu Thr Gly Ser Ile Lys Pro
65  75  85  90  95  100  105  110  115  120  125  130  135  140  145  150  155
Gly Val Ile Gly Gly Ser Lys Pro Lys Val Ala Thr Pro Lys Val Val
Asp Lys Ile Ala Glu Tyr Lys Arg Gln Asn Pro Thr Met Phe Ala Trp
Glu Ile Arg Asp Arg Leu Leu Ala Glu Gly Ile Cys Asp Asn Asp Thr
Val Pro Ser Val Ser Ser Ile Asn Arg Ile Ile Arg Thr Lys Val Gln
130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210
Gln Pro Phe His Pro Thr Pro Asp Gly Ala Gly Thr Gly Val Thr Ala
Pro Gly His Thr Ile Val Pro Ser Thr Ala Ser Pro Pro Val Ser Ser
Ala Ser Asn Asp Pro Val Gly Ser Tyr Ser Ile Asn Gly Ile Leu Gly
Ile Pro Arg Ser Asn Gly Glu Lys Arg Lys Arg Asp Glu Val Glu Val
Tyr Thr Asp Pro Ala His Ile Arg Gly Gly Gly Gly Leu His Leu Val
210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290
Trp Thr Leu Arg Asp Val Ser Glu Gly Ser Val Pro Asn Gly Asp Ser
Gln Ser Gly Val Asp Ser Leu Arg Lys His Leu Arg Ala Asp Thr Phe
Thr Gln Gln Gln Leu Glu Ala Leu Asp Arg Val Phe Glu Arg Pro Ser
Tyr Pro Asp Val Phe Gln Ala Ser Glu His Ile Lys Ser Glu Gln Gly
275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355
Asn Glu Tyr Ser Leu Pro Ala Leu Thr Pro Gly Leu Asp Glu Val Lys
Ser Ser Leu Ser Ala Ser Thr Asn Pro Glu Leu Gly Ser Asn Val Ser
Gly Thr Gln Thr Tyr Pro Val Val Thr Gly Arg Asp Met Ala Ser Thr
Thr Leu Pro Gly Tyr Pro Pro His Val Pro Pro Thr Gly Gln Gly Ser
Tyr Pro Thr Ser Thr Leu Ala Gly Met Val Pro Gly Ser Glu Phe Ser
Gly Asn Pro Tyr Ser His Pro Gln Tyr Thr Ala Tyr Asn Glu Ala Trp
370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450
Arg Phe Ser Asn Pro Ala Leu Leu Met Pro Pro Gly Pro Pro Leu
Pro Leu Leu Pro Leu Pro Met Thr Ala Thr Ser Tyr Arg Gly Asp His
Ile Lys Leu Gln Ala Asp Ser Phe Gly Leu His Ile Val Pro Val
420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500

```

&lt;210&gt;45

10 &lt;211&gt;4257

&lt;212&gt;ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

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

<400> 45

aggcct ccagt ct ccggccga gt ct t ct cgc agccgcgaacc caccct ggggc cagccagag 60  
 ct gccagcgc cgt cggct c cct cct ccc t cggccgagg cggcgt gcgc 120  
 ct gcc t t t c cgggggcggg ggccct ggccc gcgcgt ccc ct cccgcagg cgccacct cg 180  
 gacat ccccg ggal t gct ac t t ct ct gcca act t cgcga c t cggagagg 240  
 cccggct ccc ct cccggcgc cct ct gaccg ccccgcccc gcgcgt ct c cgaccaccgc 300  
 ct ct cggat g accagg t cc aggggagct g agcgagt cgc ct ccccgccc cagct t cage 360  
 cct ggct gca gct gcagcgc gagccat gc cccccagt gc accccggccc ggcccaccgc 420  
 cccggggcca t t ct gct gac cgcgccagccc cgagccccga cagt ggcaag t t cgggct ac 480  
 t gcagt t gca agct ccggcc aacccggagg agccccagcg gggagcgag t g t gcgccc 540  
 cccgcccccg cgcgccccgc agcagccggg cgt t cact ca t cct cct cc cccaccgt cc 600  
 ct cct t t t c t cct caagt c ct gaagt t ga gl t t gagagg at at gact g caaacgagc 660  
 cgt gct ccc gct cct ct gc ggt gt gaacc gct cggggg ggt gt t t g t aacggccggc 720  
 ccat acccga cgt ggt gagg cagcgcat cg t ggagct ggc acggct gt gt ccaccagggt 840  
 gt gacat ct c ccggcagct g cgggt cagcc acggct gt gt cagcaaat c ct gggcaggt 900  
 act acgagac cggcagcat c aagccgggt g t gal cgggt gg ct ccaagccc aaagt ggcga 960  
 cgcccaagt ggt ggacaag at t gct gaat acaaacgaca gaacccgact at gt t cgcct 1020  
 gggagat t cg agaccggct c ct ggcgagg ct gt ga caat gacaca gt cccagcg 1080  
 t ct ct t ccat caacagaat c at ccggacca accgcccc g gccacacct t gt t cccagc 1140  
 at ggggt gg gacaggagt g accgcccc g t gggat cct a t gt t cccagc acggcct ccc 1200  
 ct cct gt t t c cagcgct cc aat gaccag t gggat cct a ct ccat caat gggat cct gg 1260  
 ggal t cct cg ct ccaat ggt ct ggcgagg gcat ct gt ga agt t gagg a t acat gat c 1320  
 ct cccacat t agaggagt gagggt t t gc at ct ggt ct g gact t t aaga gat gt gt ct g 1380  
 agggct cagt ccccaat gga gal t cccaga gt ggt gt gga gt t t ggg aagcact t gc 1440  
 gagct gacac ct t caccag cagcagct gg aagct t t gga t cgggt ct t t gagcgt cct t 1500  
 cct accct ga cgt ct t ccag gcat cagagc acat caaat c agaacagggg aacgagt act 1560  
 cct cccag cct gacccc t ggt t gal g aagt caagt c gact ct at ct gcat ccacca 1620  
 accct gacgt gggcagcaac gi gt caggca cacagacat a cccagt t gt g act ggt cgt g 1680  
 acat ggcgag caccact ct g cct ggt t acc cccct cact g ccccccact ggccaggga 1740  
 gct accccac ct cccact g t gct gggag t gct gggag cgagt t ct cc ggcaaccct 1800  
 acagccacc cagct acag gct acaacg aggt t ggag al t cagcaac cccgct t ac 1860  
 t aat ggcgc ccccggt ccg cccct gccgc t gct gccgt gcct at gacc gccact agt t 1920  
 acccgggga cccat caag ct t caggccg acagct t cgg cct ccacat c gt cccgct ct 1980  
 gacccaccc cggaggagg gaggaccgac ggcagcgat gcct cccggc caccgcccc 2040  
 gcct caccac at cccacgac ccccgcaacc ct t cact ca cccct cga aggt cggaca 2100  
 ggacgggt gg agccgt gggc gggaccct ca gggccggggc cggccgct ga 2160  
 gccgcccc cccgct gcc t ggact gcgc ggcgcct ga gggggat t cg gccagct cg 2220  
 t cccgcccc caccagcca gcccagcca cccgagcca cct gccga ct cgggcggc 2280  
 acct gct ggc gcgcgccga t gt t t ct gt g acacacaat c agcgcggacc gcagcgccg 2340  
 ccagccccgg gacccgct cggacgt cg ggcgccagga ggt t cgt g gagggggt gg 2400  
 gccaaaggaga t t aagaagaa t gcaggagga agagcccgt gcccgaat ccc 2460  
 t gggaaaaat t ct t t t ccc cagt gccagc cggact gcc t cgcct t ccc ggt gt gccct 2520  
 gt cccagaag at ggaat ggg ggt gt ggggt t cggct ct a ggaacgggt t t gggggct 2580  
 cagg t ct t t c caagg t ggg acccaaggat cggggggccc agcagcccc 2640  
 ccggact ct c ggct ct t cact t gct cct cct ggcct gcc a gt t cccagg 2700  
 t cct gct cgg agaccggct ct cct gccag cct t gccct acct cagegt ct ct t cacc 2760  
 t gct ggct c ccagt t t ccc ct cct cggag ct cct cggg at cccct gac gccct gcat c 2820  
 ct cct cct c act cgcagc ccat cggag ct t cccgg cct ct cccgg agccagt t t c 2880  
 cat agact gc ggact ggggt ct t cct ccag cagt t act t g at gcccc c cccgacaca 2940  
 gact ct caat ct gccgt gg t aagaaccgg t t ct gagct g gcgt ct gage t gct gcggg 3000  
 t ggaagt ggg gggct gcca ct cact cct cccat cccct cccagcct cc t cct cggga 3060  
 ggaact gaac agaaccaca aaagt ct aca t t t at t t aat at gal ggt ct t t gcaaaaag 3120  
 gaacaaaaca acacaaaagc ccaccaggct gct gct t t gt ggaagacgg t gt gt ct cgt 3180  
 gt gaaggcga aacccgt gt acat aacccc t cccct cgg ccccgcccc t gt gt ct cgt 3240  
 t agagt cct gt cgcgccgc ggccct gcc gt agat acgc cccgt gt ct gt gct gt gag 3300  
 agt cgcct ggc cgt gggggg gaaggggggg acacagct ac acgccc t a aagcacagca 3360  
 cgt cct ggg gaggggggca t t t t t t at gt t acaaaaaa aal t acgaaa gaaaagaaat 3420  
 ct ct at gcaa aat gacgaac at ggt cct gt gact cct ct ggcct gt t t gt t gct ct t 3480  
 t ct ct gt aat t cgt gt t t c cgt t t t t c t cct gccct ct ct cct cct c 3540  
 t cct ct cgc t t ct ct cccc ct ct gt ct ct gt ct ct ct cct cct cct cct cct c 3600  
 t ct gt ct ct c ct ct t t cct c ggct ct ct c cccagacct g gcccggccgc cct gt ct cgt 3660  
 caggct agat ccgagg ggc agct ccagcc cccgggt cg cccct cgc ggcgt gccc 3720  
 gcgcgcccg ggcggcgaa ggccggggc cccgt cccg cccgt agt t gct ct t t cgg 3780  
 t agt ggcgt ggcct gca t gt ct cct ca cccgt ggt c gi gacgact c gaaat aacag 3840  
 aaacaaagt c aat aaagt ga aaat cct t ga aaaaat ccga aaaggct t gg 3900  
 agt cct cgc cagat ct ct c t cccct gcga t t t gagaagg aaaaagagaa 3960  
 aagagaat cg t t t aaggga cccggcgccc agccaggct c cagt gggccg aacggggcg 4020

```
cgagggcggc gagggcgccg aggtccggcc catcccagt c ctgtggggct ggccgggag 4080
agaccccgga cccaggccca ggcctaacct gctaaatgt c cccggacggg tctgggtctcc 4140
tcggccacit t cagtgcgic ggttcgtttt gattctttt cttttgigca catagaaat 4200
aaat aat aat aat aaat aaa gaat aaaat t ttgtatgtca aaaaaaaaaa aaaaaaa 4257
```

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

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética  
<400> 46

```
ttcacccttg actgtggcac ctcccttcag ttccgtcgac gaggttgtgc aatccaccag 60
tcttat aaat acagtgacgc tccagcctct ggaagcctct gtca 104
```

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

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

<400> 47  
tcaagcgt ga ct aat t g 17

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

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

<400> 48  
actgcccatt gcccaaacac 20

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

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

<400> 49  
aaaat ct t gc cagct 11 ccc c 21

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

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

<400> 50  
gtcggt t acg gagcggaccg gag 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  
 20     gcgct t gt gt cgccat t gt a 11 c      23

<210>53  
 <211>24  
 <212>ADN  
 25     <213> Secuencia artificial

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

<400> 53  
 30     gt cacaccac agaagt aagg 11 cc      24

<210>54  
 <211> 23  
 35     <212>ADN  
       <213> Secuencia artificial

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

<400> 54  
 40     gt cggt t acg gagcggaccg gag      23

<210>55  
 <211> 25  
 45     <212>ADN  
       <213> Secuencia artificial

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

<400> 55  
 50     cacagagcat t ggcgat 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

<400> 56  
 60     acccgact at gt t cgcct gg              20

<210>57  
 65     <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  
       gucgagucua ucugcaucct t      21

30     <210>60  
       <211>21  
       <212>ARN  
       <213> Secuencia artificial

35     <220>  
       <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética

      <400> 60  
       ggaugcagau agacucgact t    21

40     <210> 61  
       <211> 19  
       <212>ADN  
       <213> Secuencia artificial

45     <220>  
       <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética

50     <400> 61  
       tcagcagtgg agggcaatg      19

55     <210>62  
       <211> 23  
       <212>ADN  
       <213> Secuencia artificial

60     <220>  
       <223> Descripción de la secuencia artificial: nota = Construcción sintética

      <400> 62  
       cct ct gt aac aggt gcct t g aat    23

65     <210>63

<211>21  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

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

<400> 63  
 acagcaaacc t cct cacagc c 21

10

<210>64  
 <211> 20  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial

15

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

<400> 64  
 t ggagacgt g gcacct ct t g 20

20

<210>65  
 <211> 24  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial

25

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

<400> 65  
 t at gat accc gggagat cgt gat c 24

30

<210>66  
 <211> 24  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial

35

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

<400> 66  
 gt gcagat gc cggg t caggat act c 24

40

<210>67  
 <211> 20  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial

45

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

50

<400> 67  
 t cagccct gg act acct gca 20

55

<210>68  
 <211> 20  
 <212>ADN  
 <213> Secuencia artificial

60

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

<400> 68  
 gaggt cccgg t acaccacgt 20

65

## 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 N°: 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 N°: 43 y 47, SEC ID N°: 44 y 48 y SEC ID N°: 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  $\beta$ -actina y/o seleccionándose preferentemente el tercer par de cebadores de PCR del grupo que consiste en SEC ID N°: 42 y 46 y SEC ID N°: 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  $\beta$ -actina y el segundo gen de control es preferentemente el gen GAPDH.

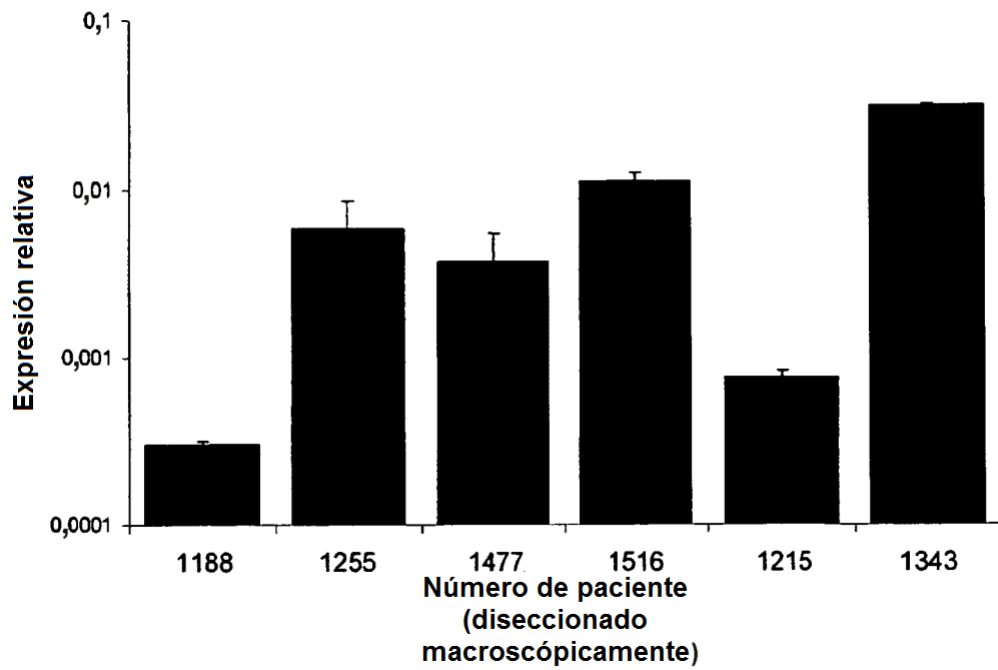
20 3. El kit de la reivindicación 1 ó 2, que adicionalmente comprende una ADN polimerasa, reactivos para la reacción PCR, una transcriptasa inversa y/o reactivos para la extracción del ARN.

4. Un método *ex vivo* para monitorizar afecciones de próstata en un sujeto, que comprende:

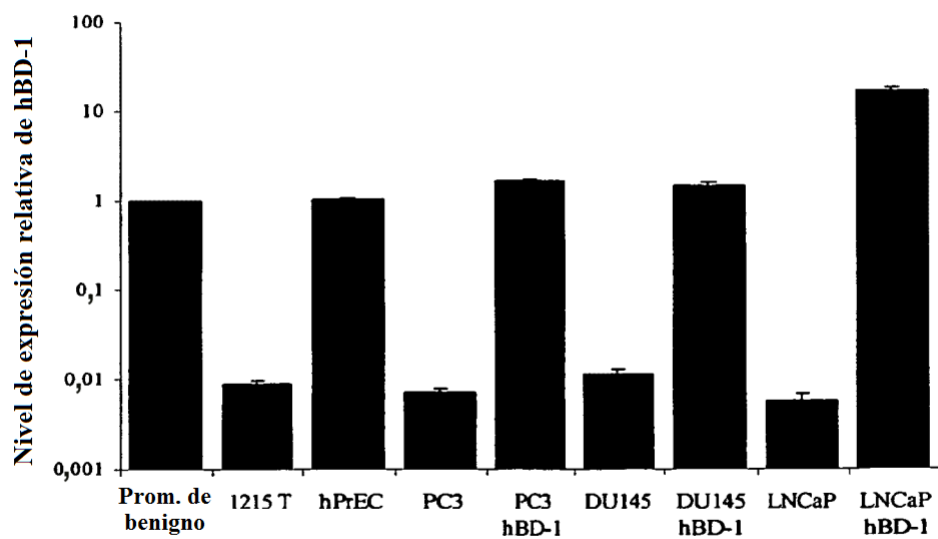
- 25 determinar la proporción de la expresión del gen de caja emparejada 2 con respecto al gen beta defensina-1 (PAX2 con respecto a DEFB1) en células obtenidas de la próstata del sujeto, en el que la proporción de la expresión de PAX2 con respecto a DEFB1 se correlaciona con afecciones prostáticas.
- 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:

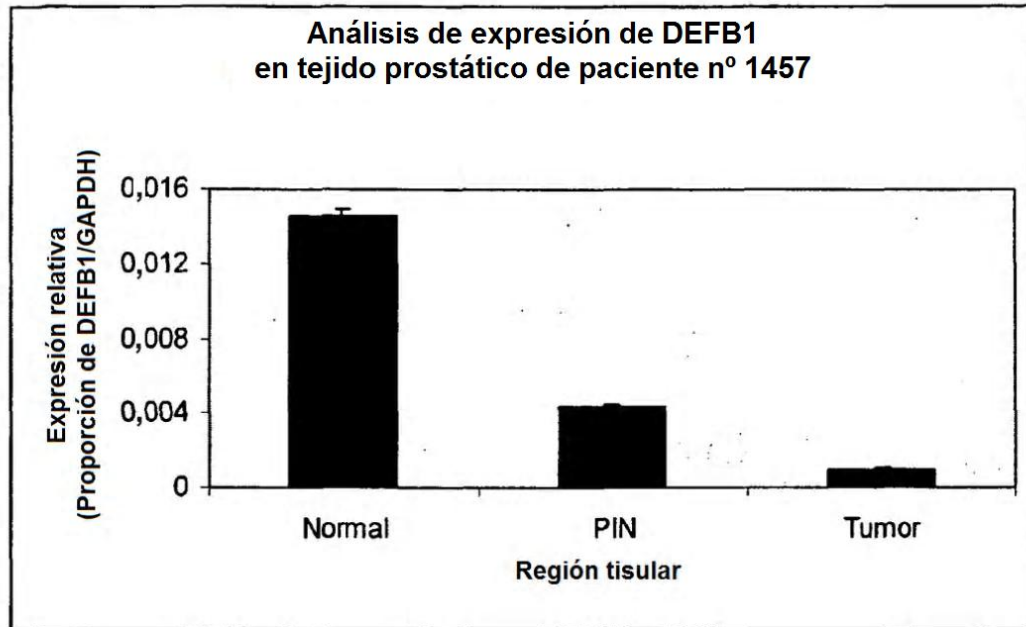
- determinar el nivel de expresión del gen PAX2 con respecto al nivel de expresión de un gen control, siendo preferentemente el gen control el gen GAPDH;
- 40 determinar el nivel de expresión del gen DEFB1 con respecto al nivel de expresión del mismo gen de control, siendo preferentemente el gen de control 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.



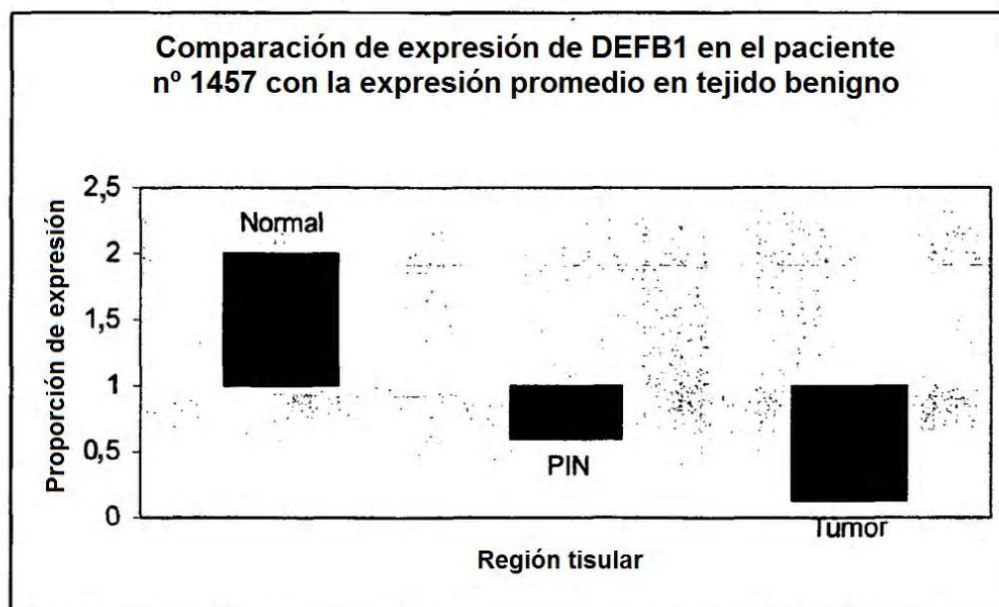
**FIG 1A**



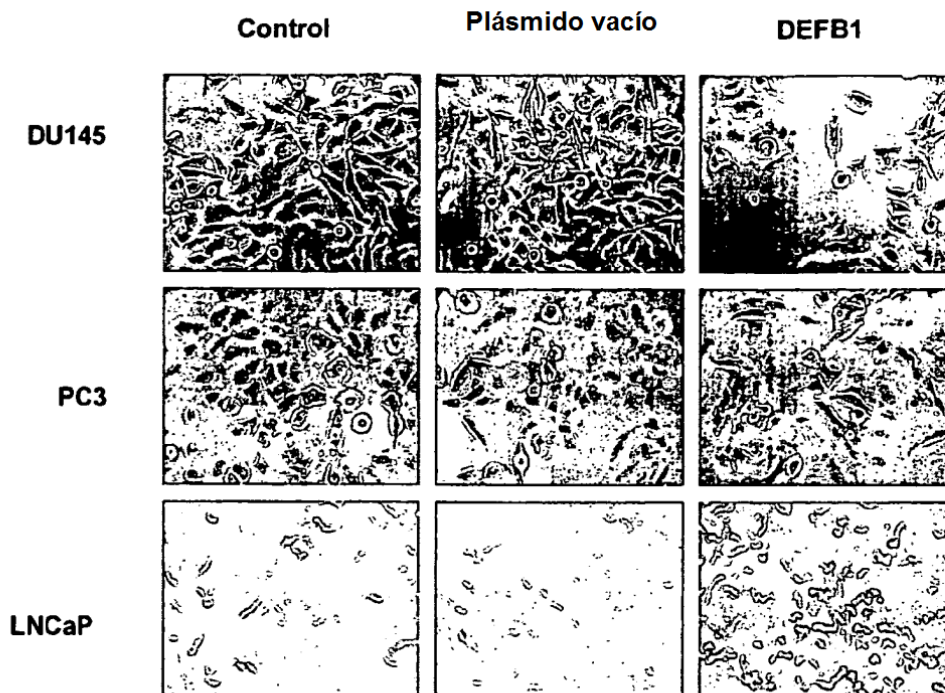
**FIG 1B**



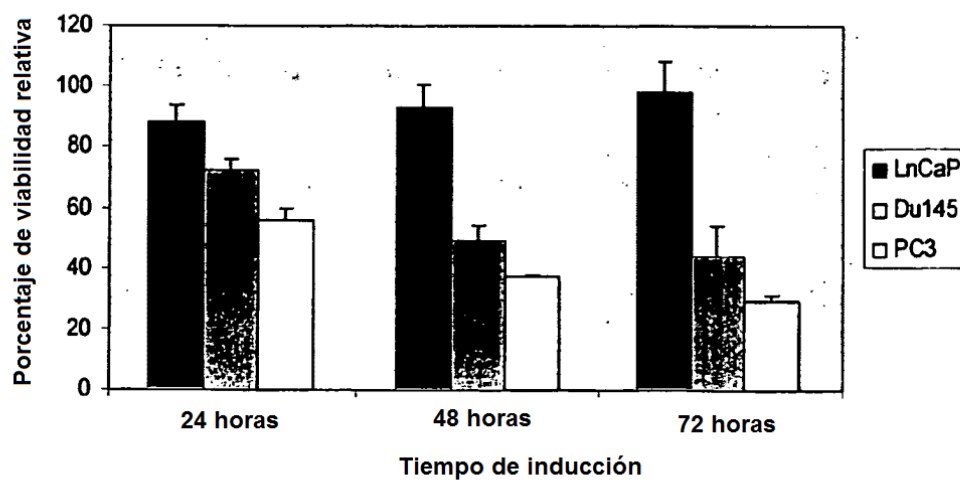
**FIG 1C**



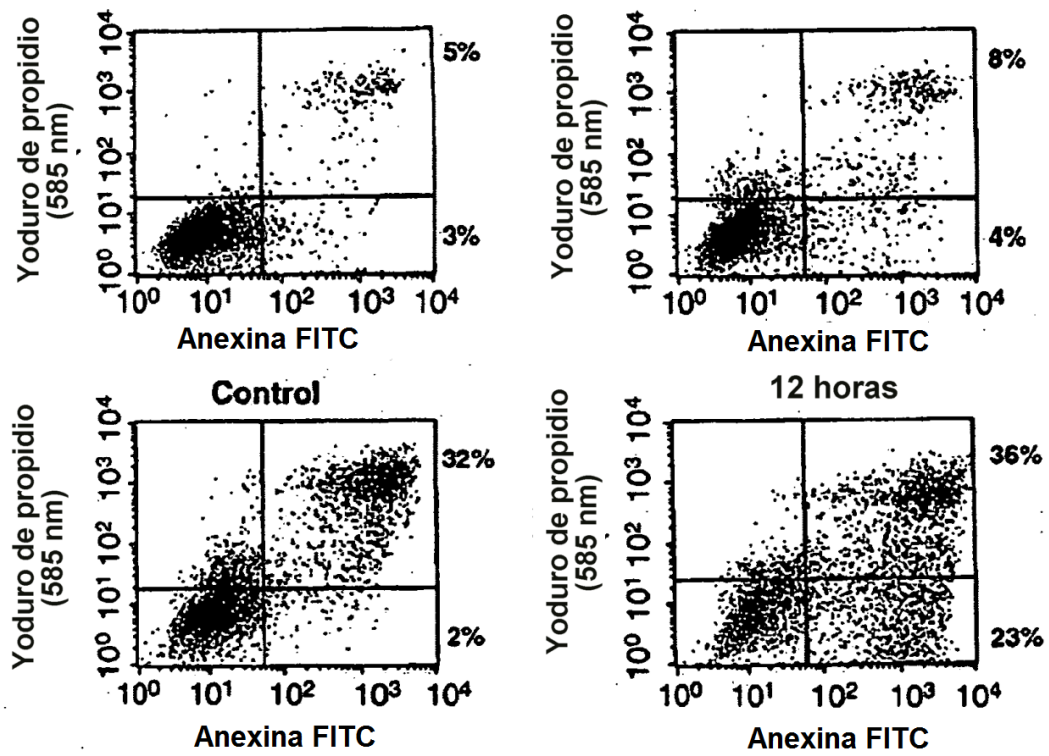
**FIG 1D**



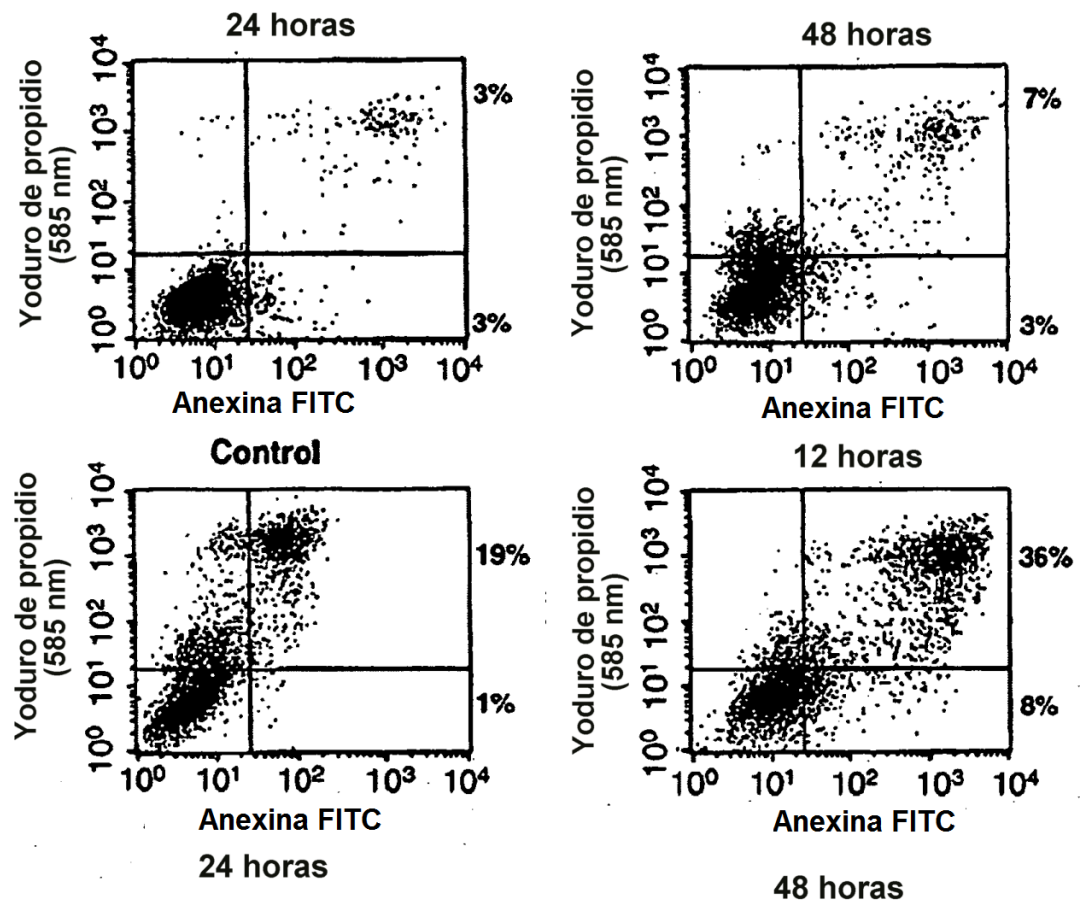
**FIG 2**



**FIG 3**

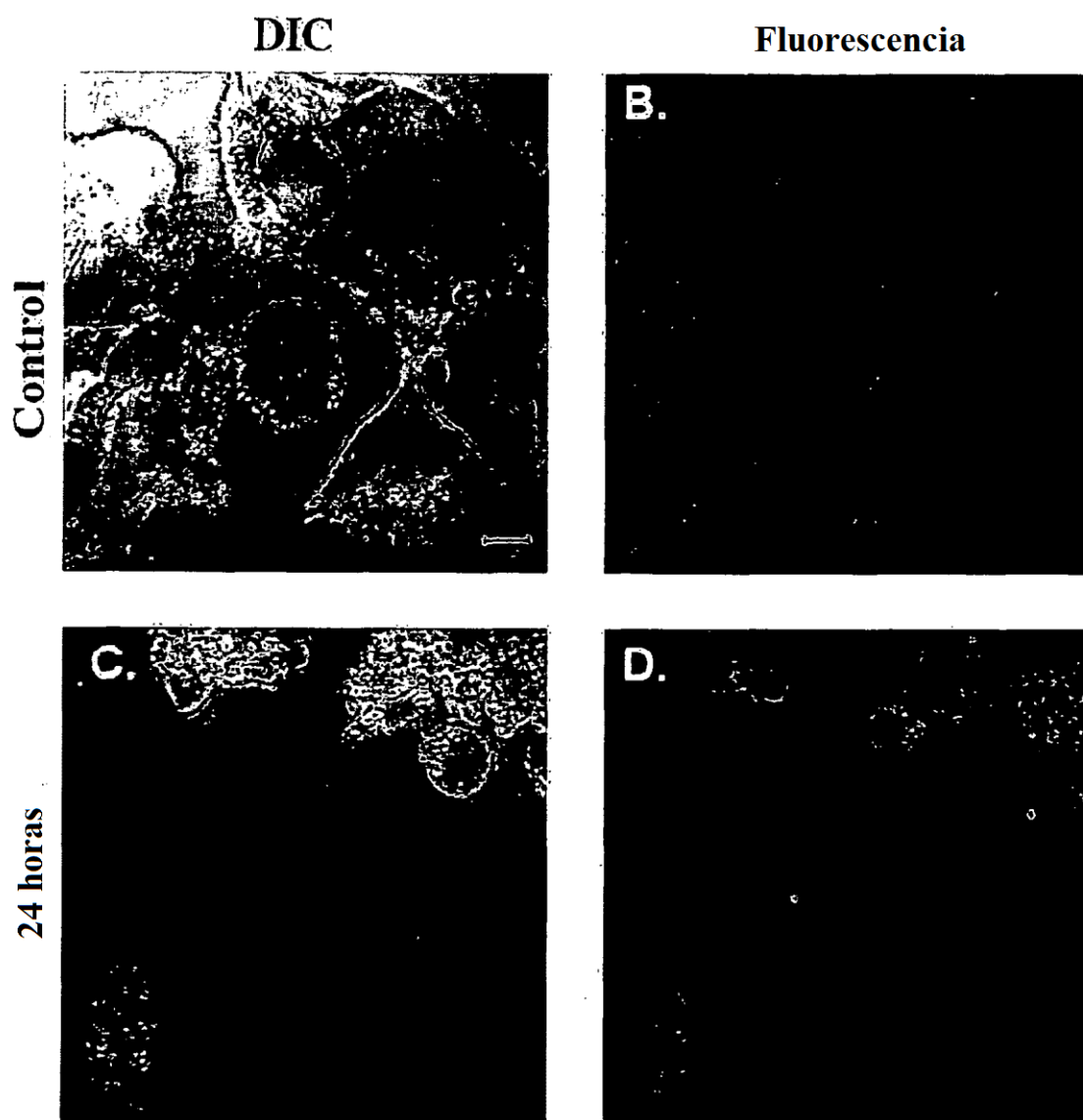


**FIG 4A**

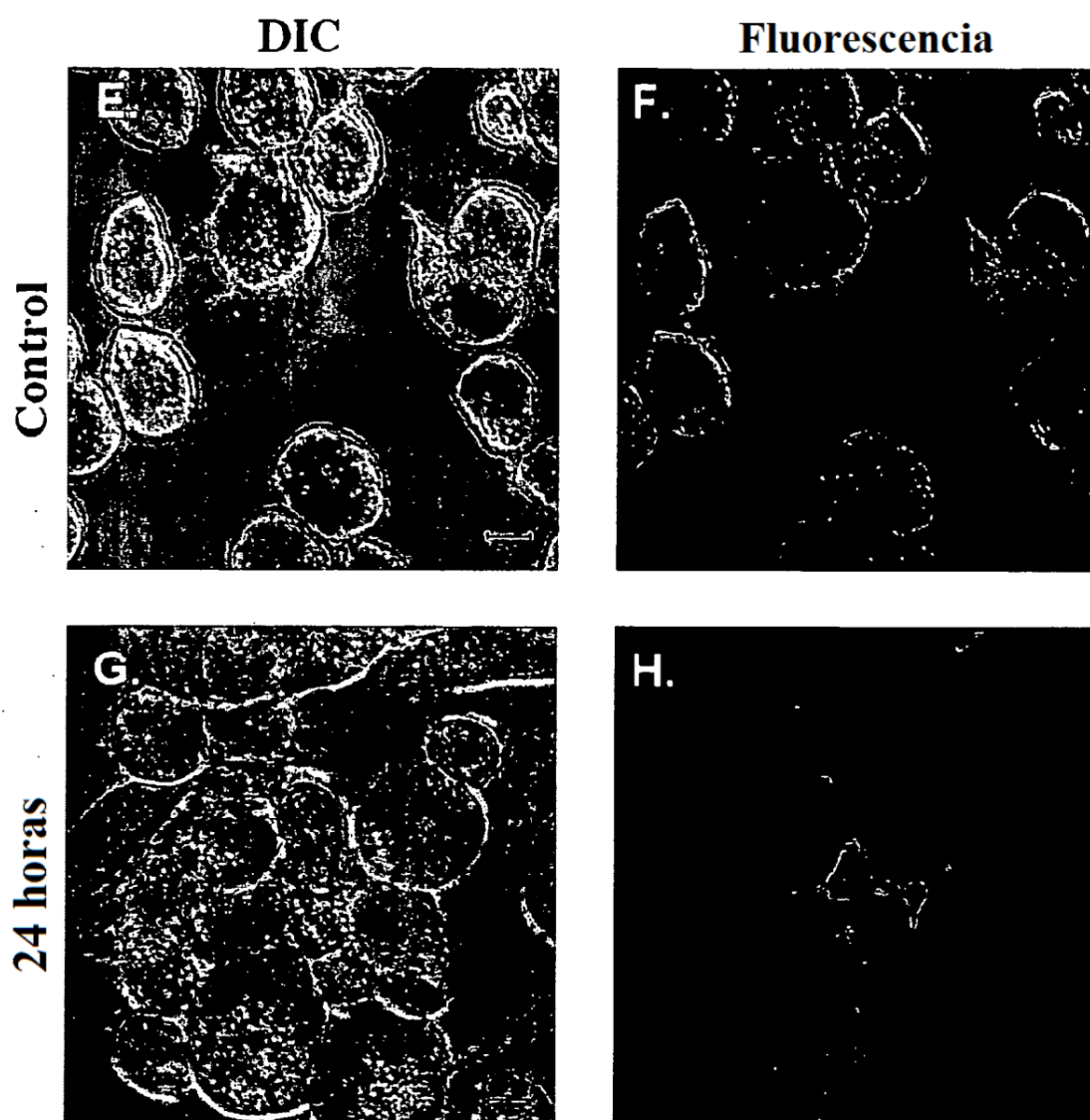


**FIG 4B**

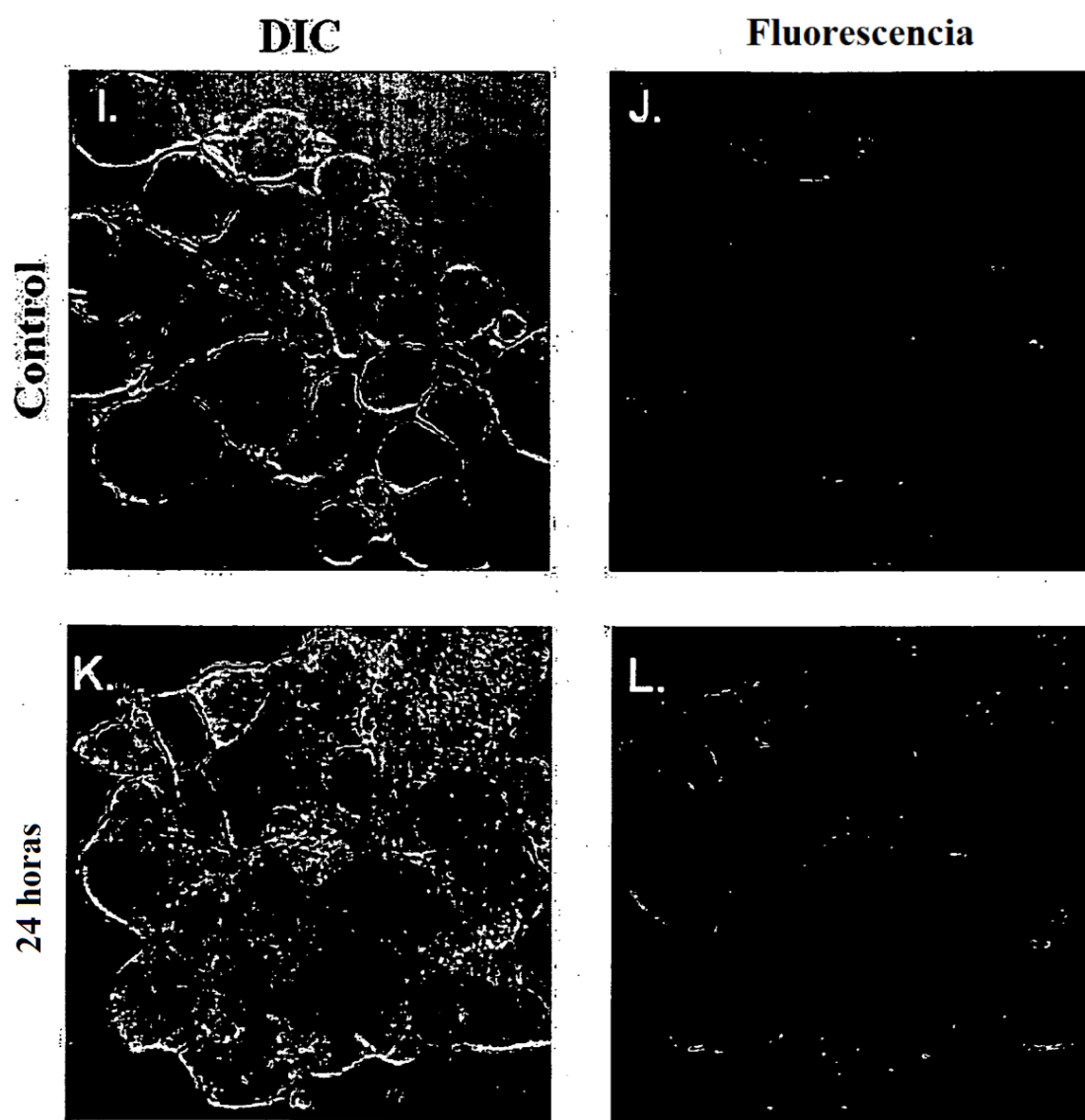




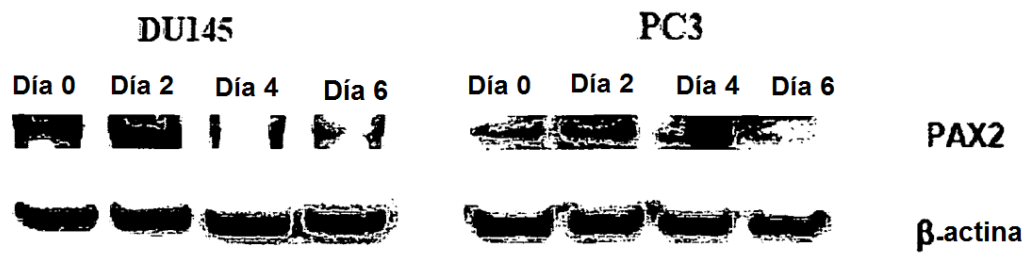
**FIG 5A-D**



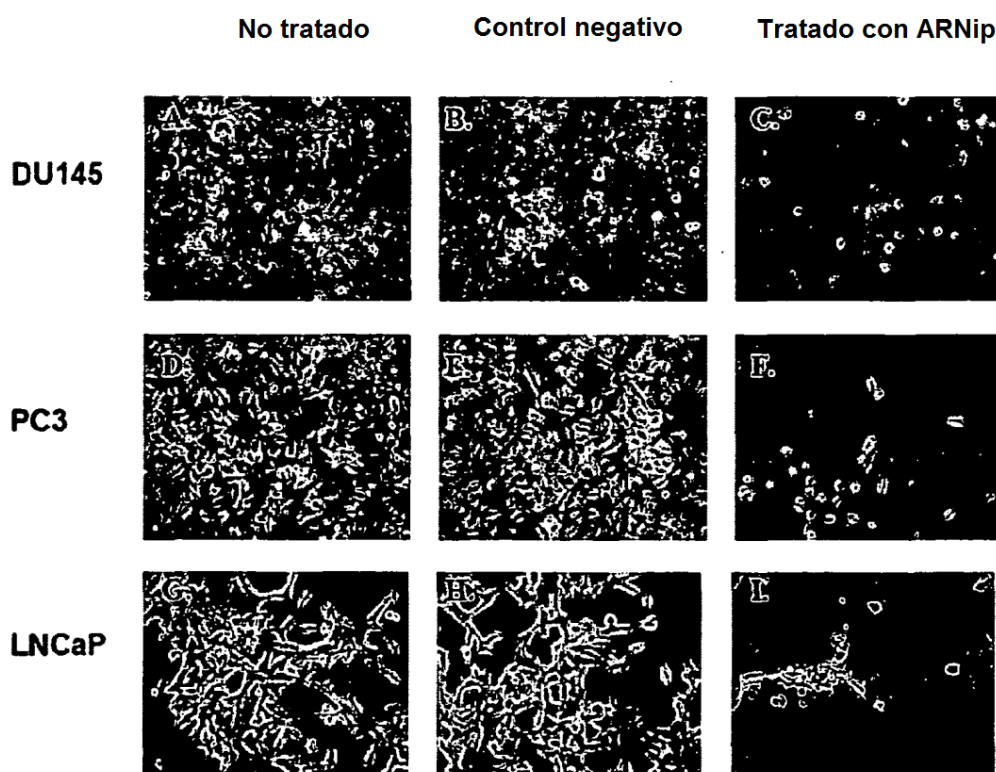
**FIG 5E-H**



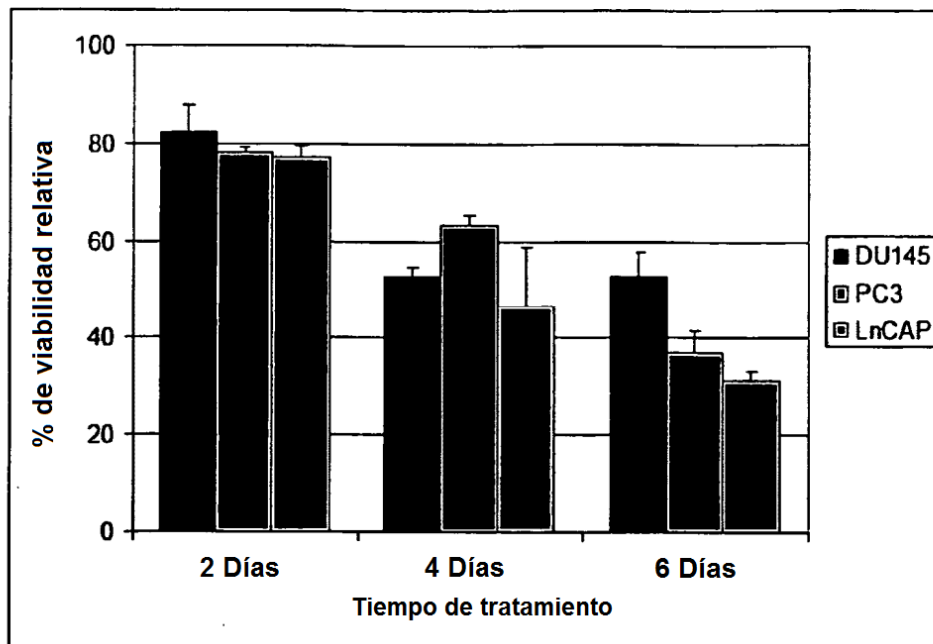
**FIG 5I-L**



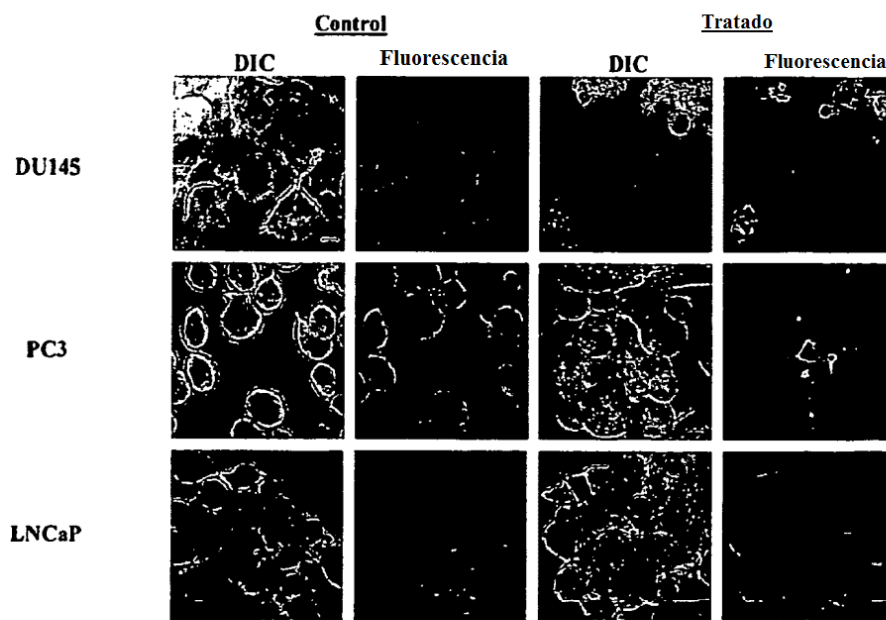
**FIG 6**



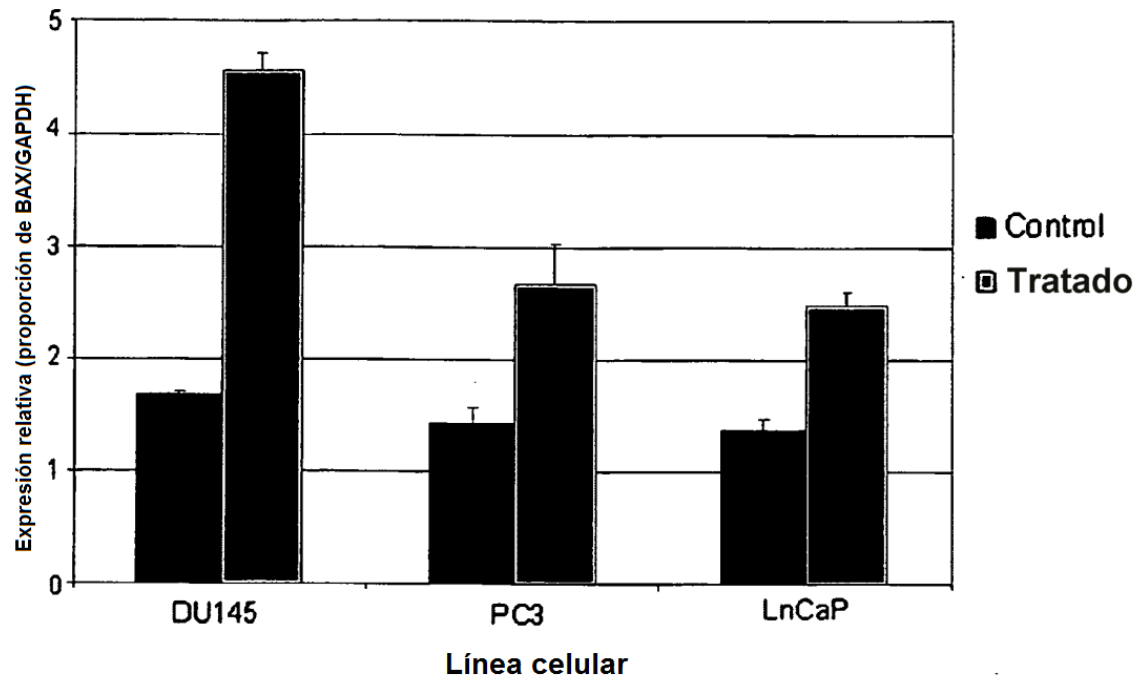
**FIG 7**



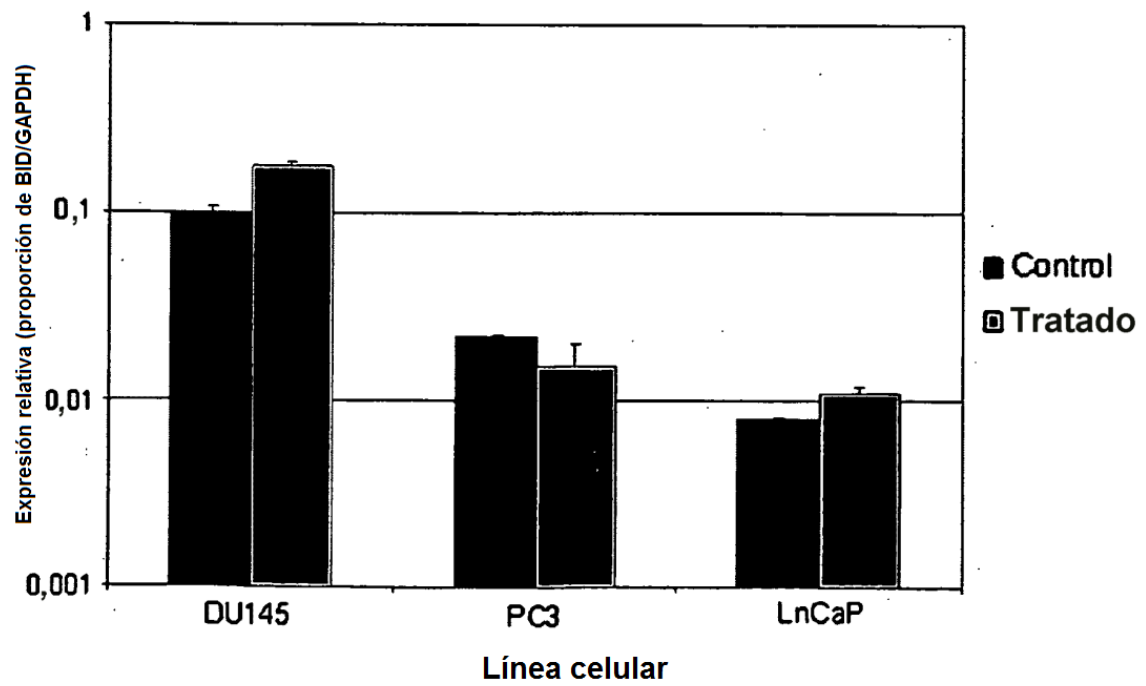
**FIG 8**



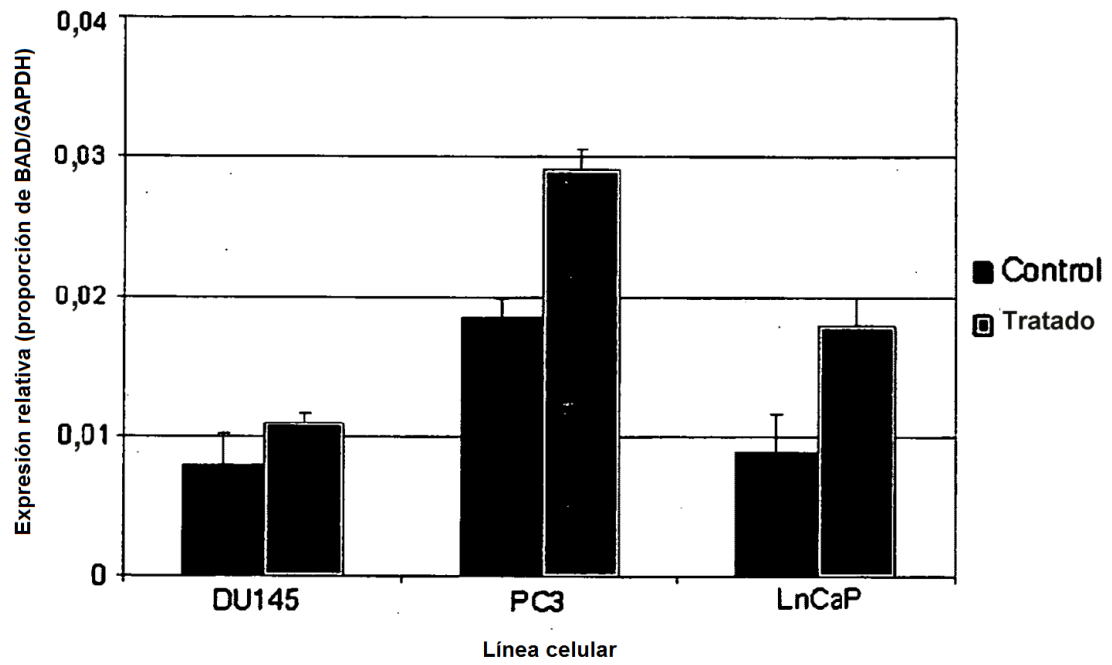
**FIG 9**



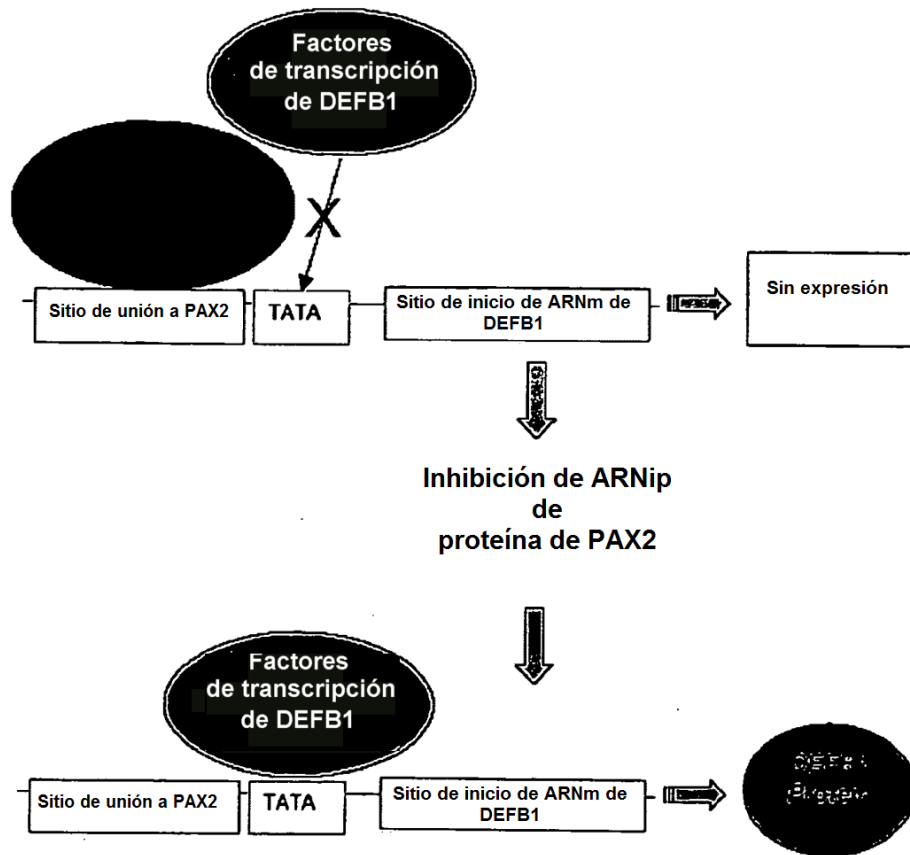
**FIG 10A**



**FIG 10B**

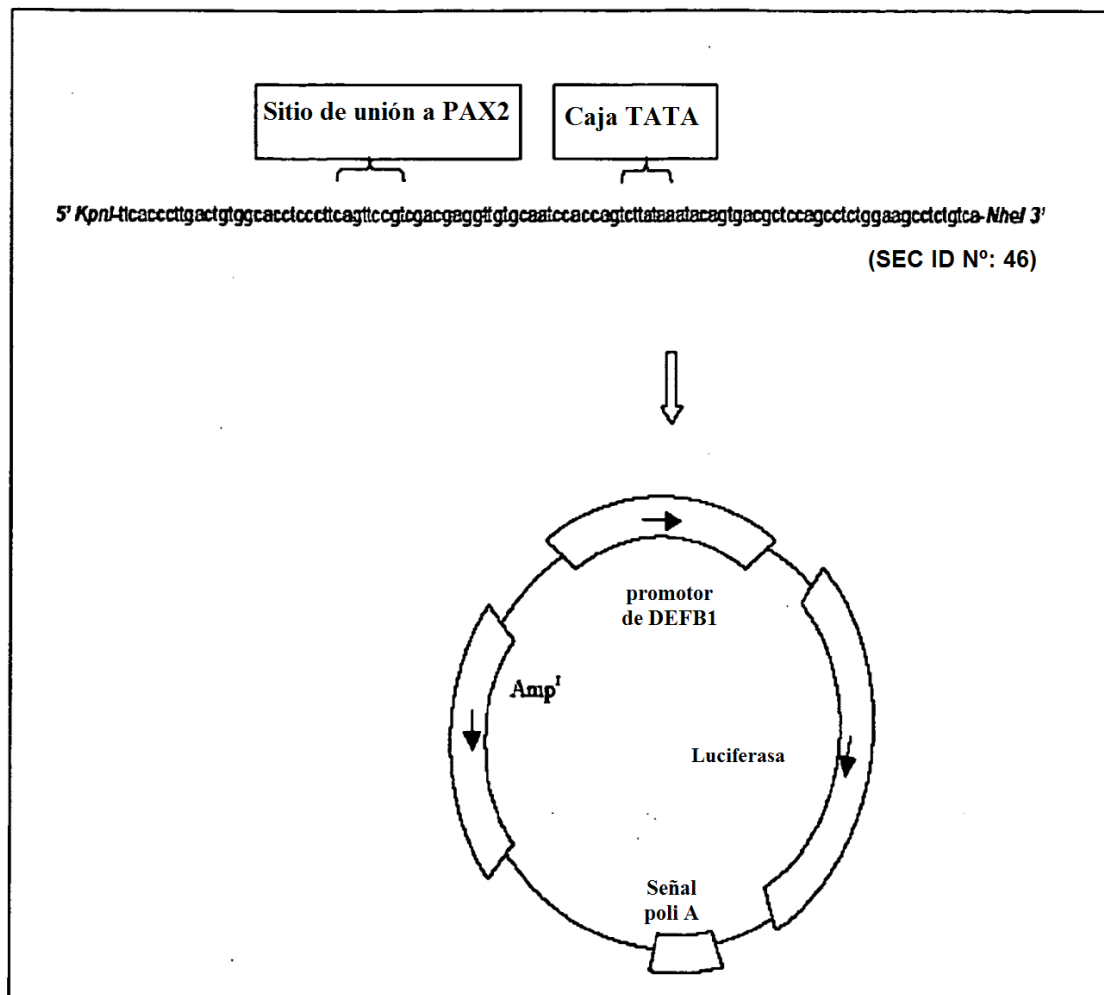


**FIG 10C**

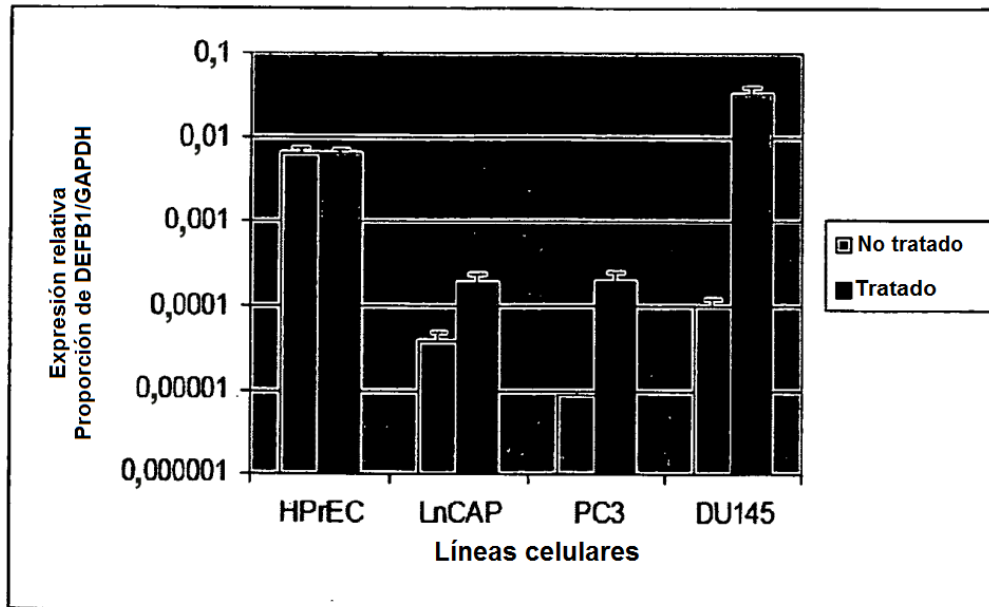


**FIG 11**

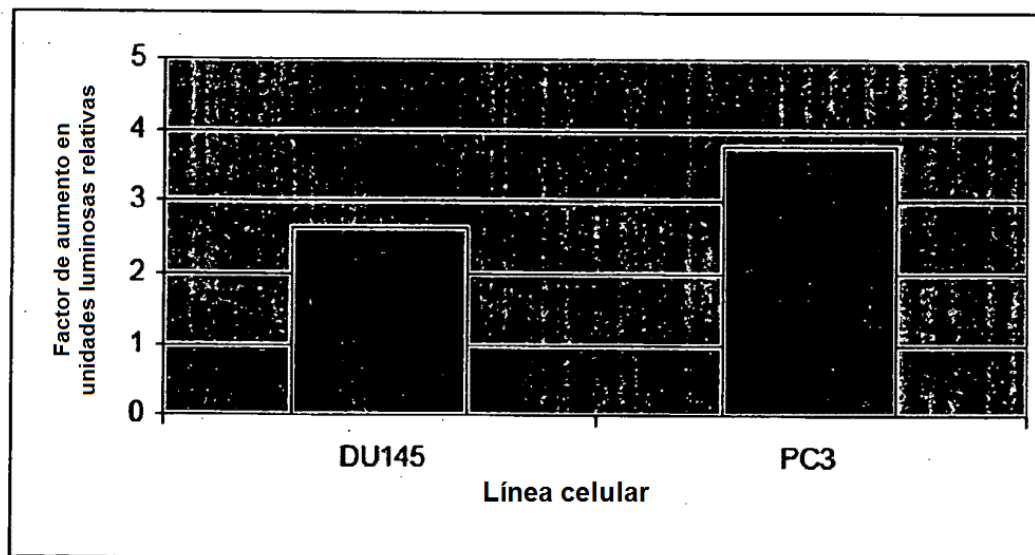




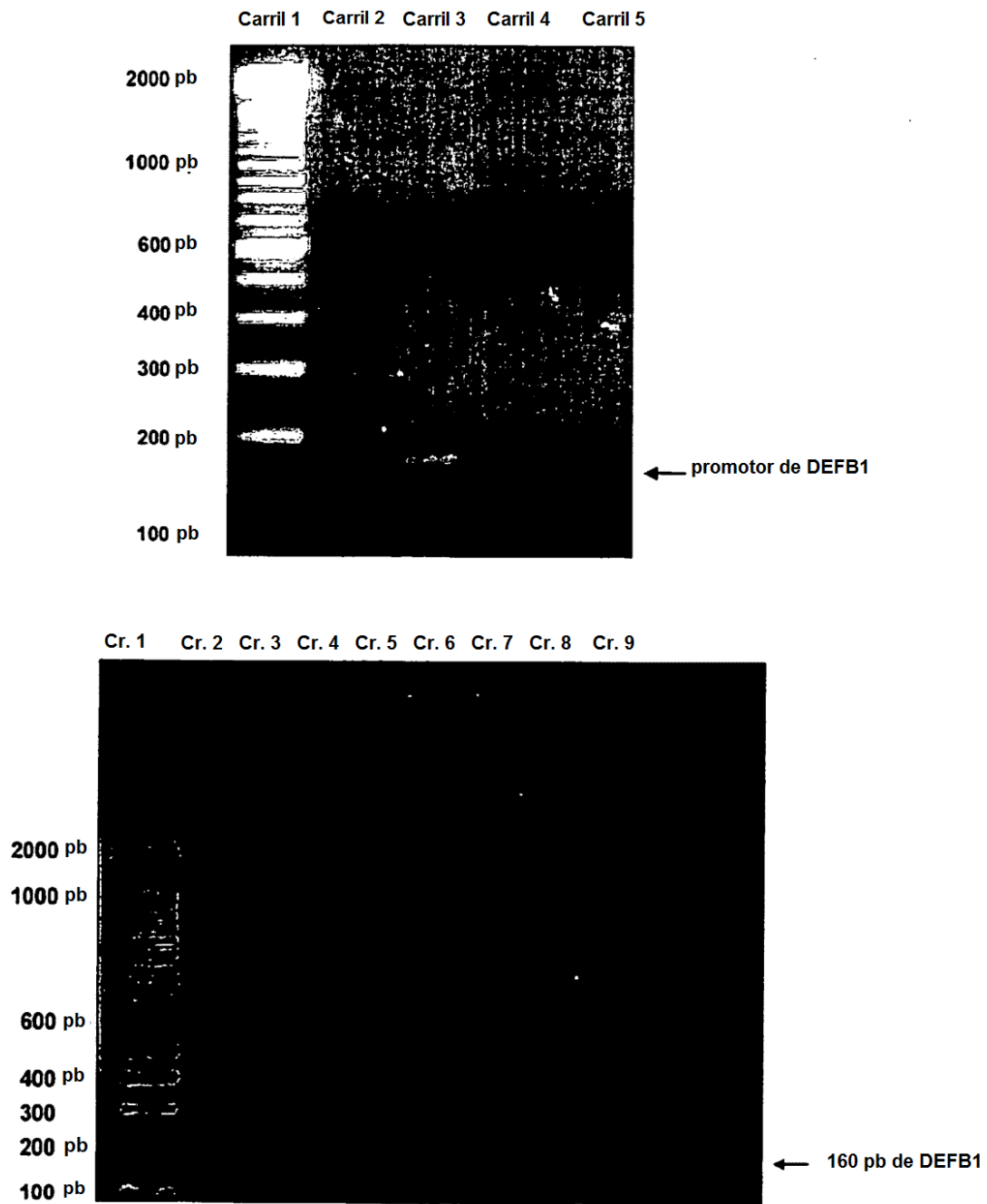
**FIG 12**



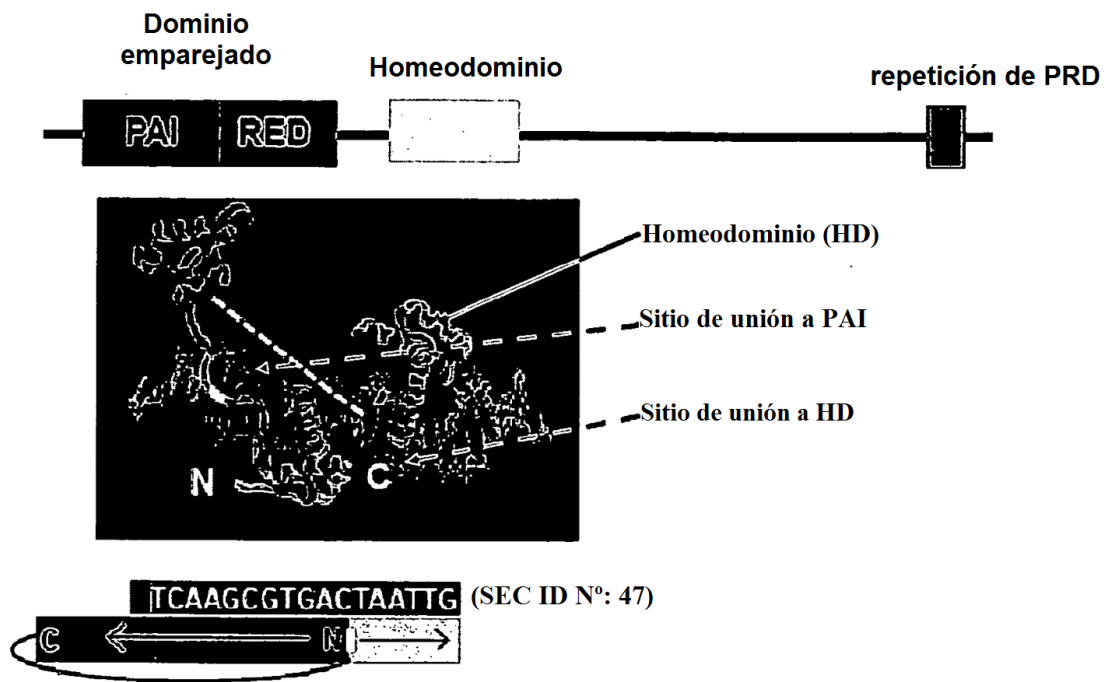
**FIG 13**



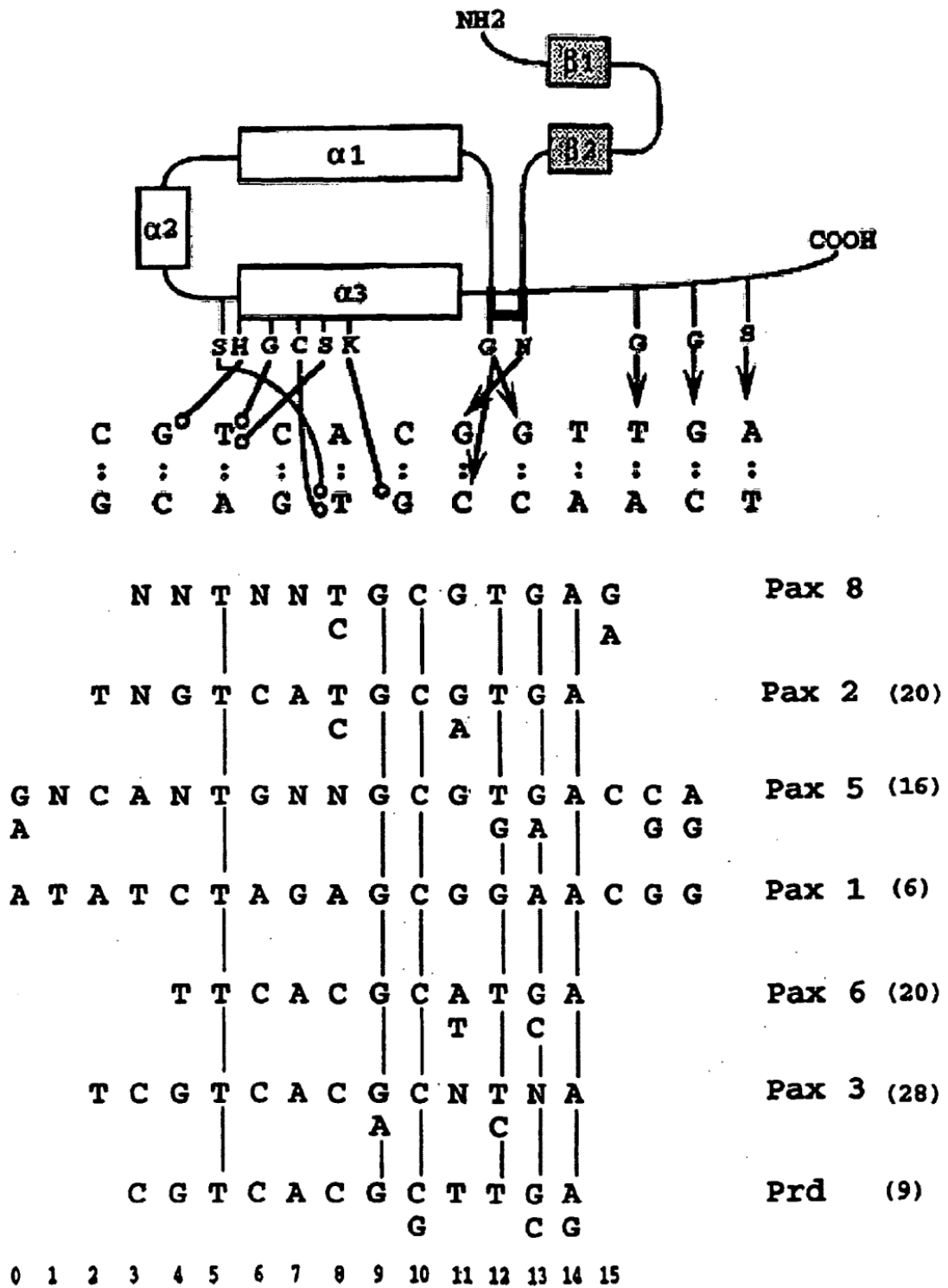
**FIG 14**



**FIG 15**



**FIG 16**



**FIG 17**

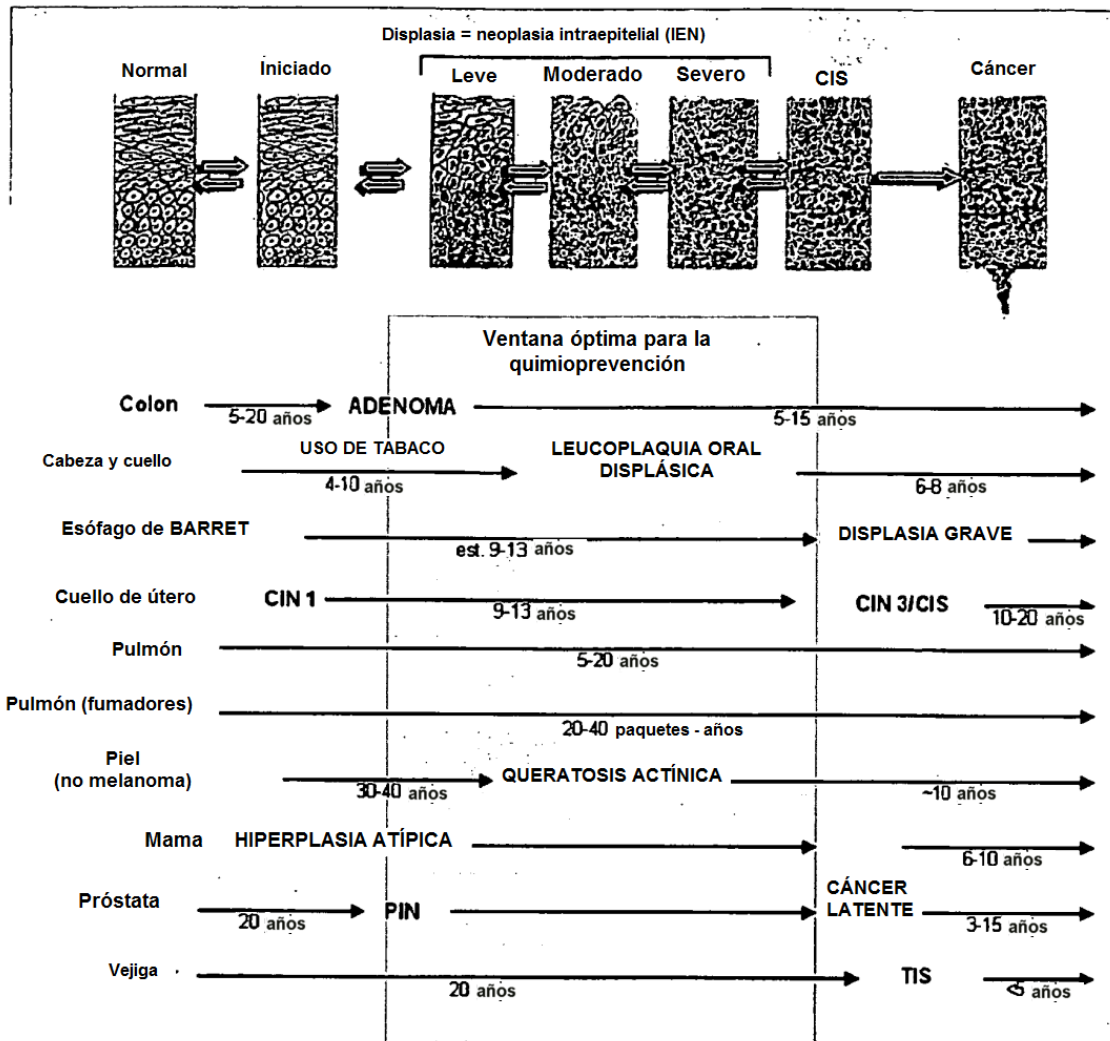


FIG 18

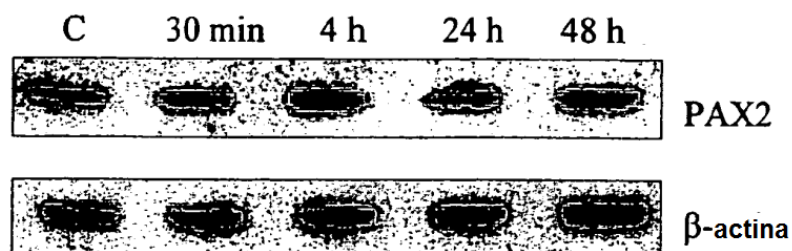
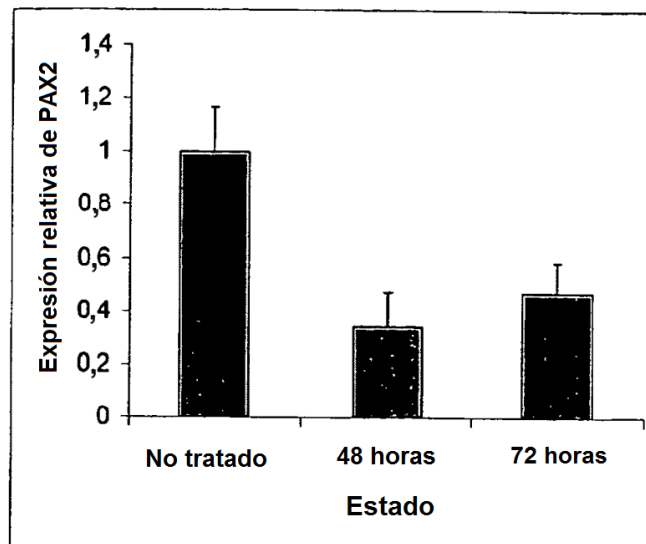
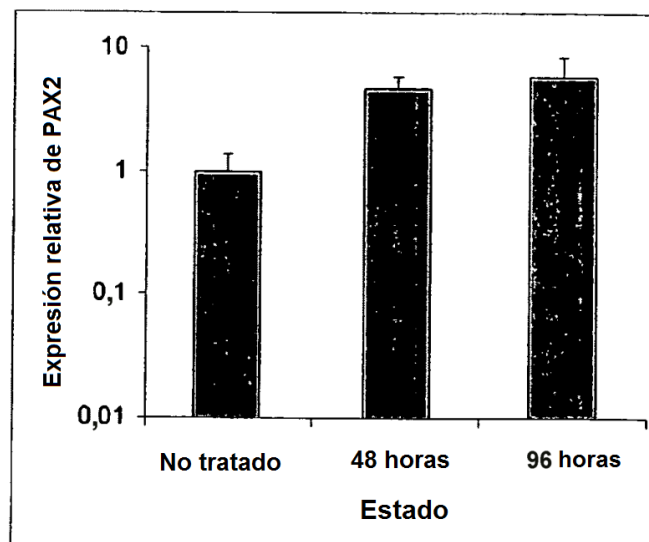


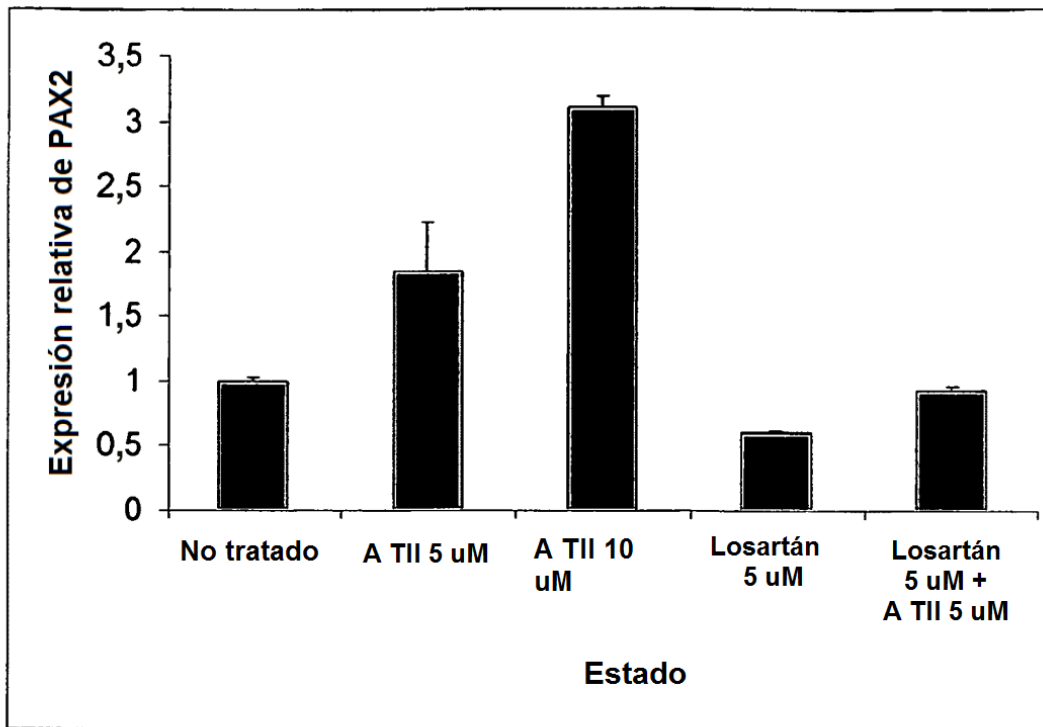
FIG 19



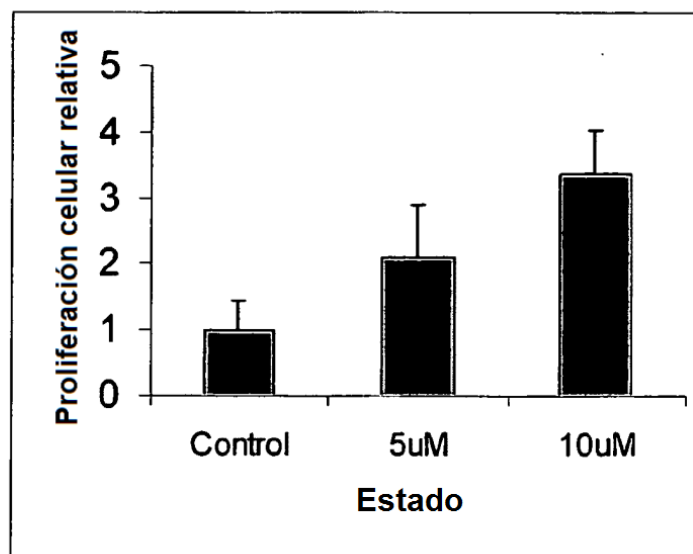
**FIG 20A**



**FIG 20B**

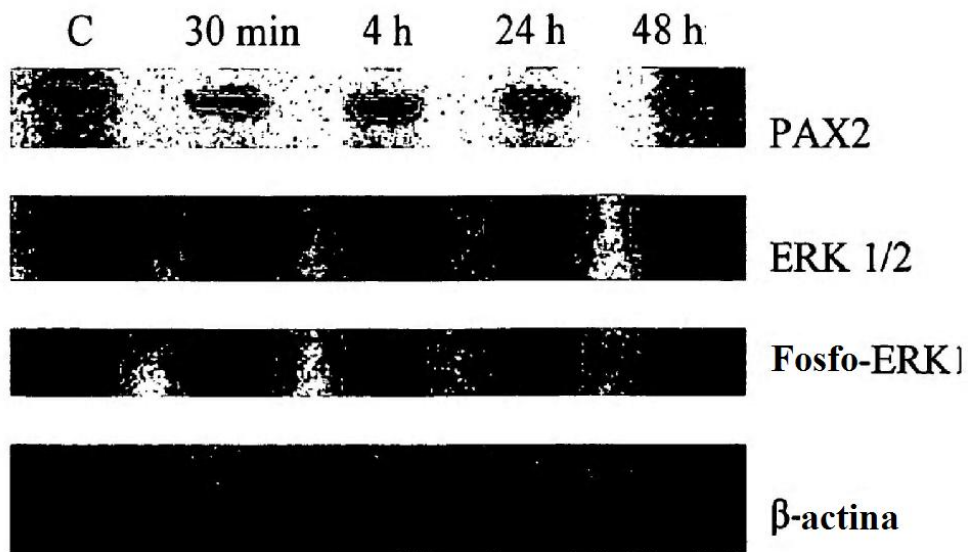


**FIG 21**

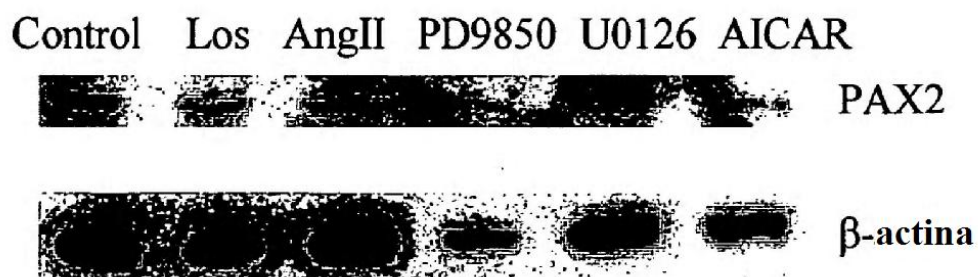


**FIG 22**

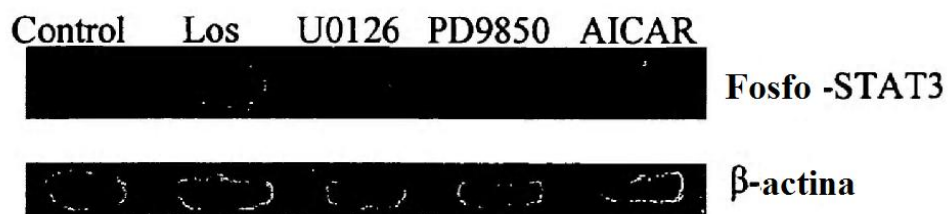




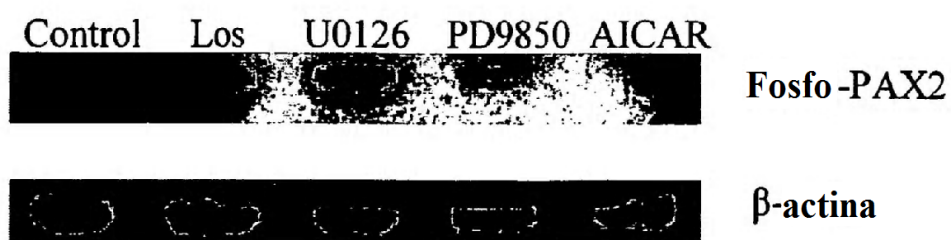
**FIG 23A**



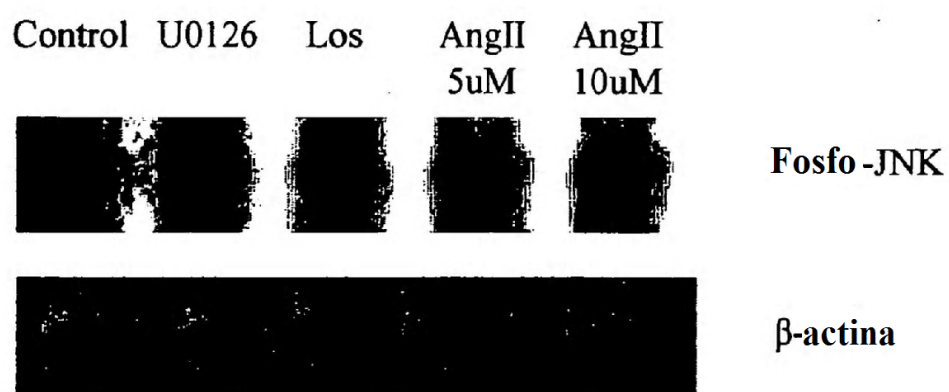
**FIG 23B**



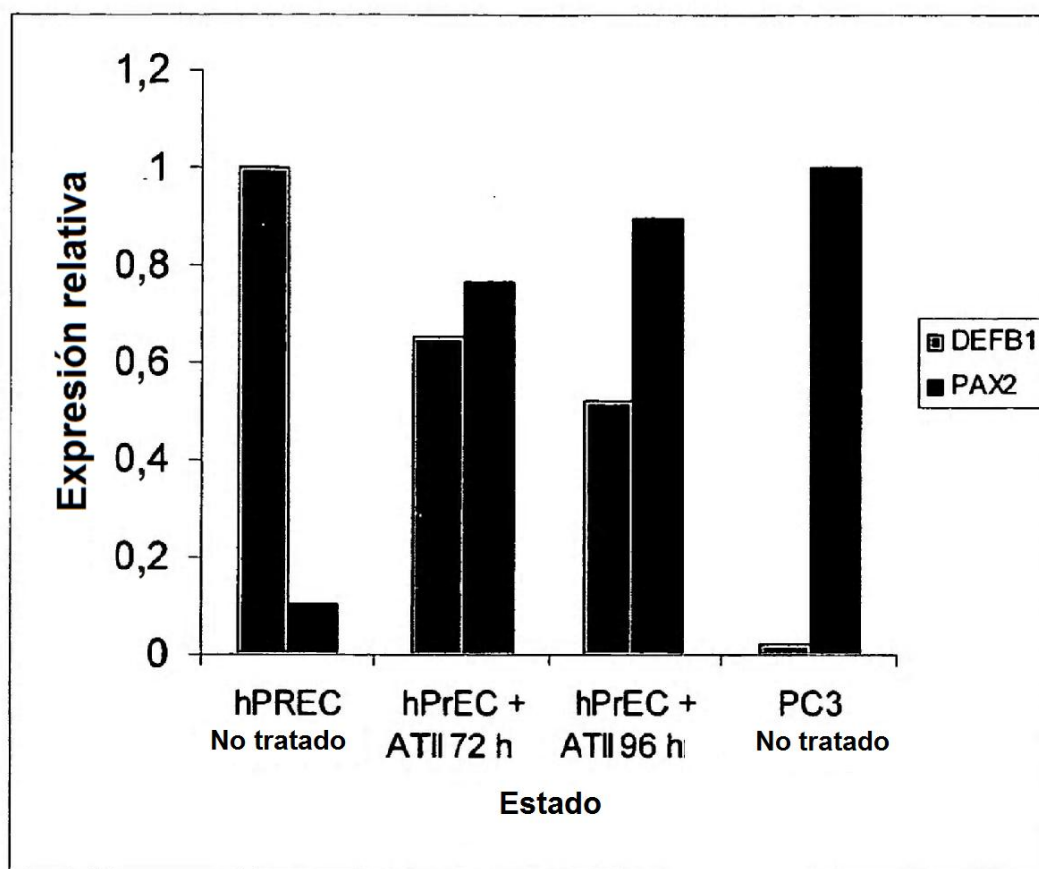
**FIG 23C**

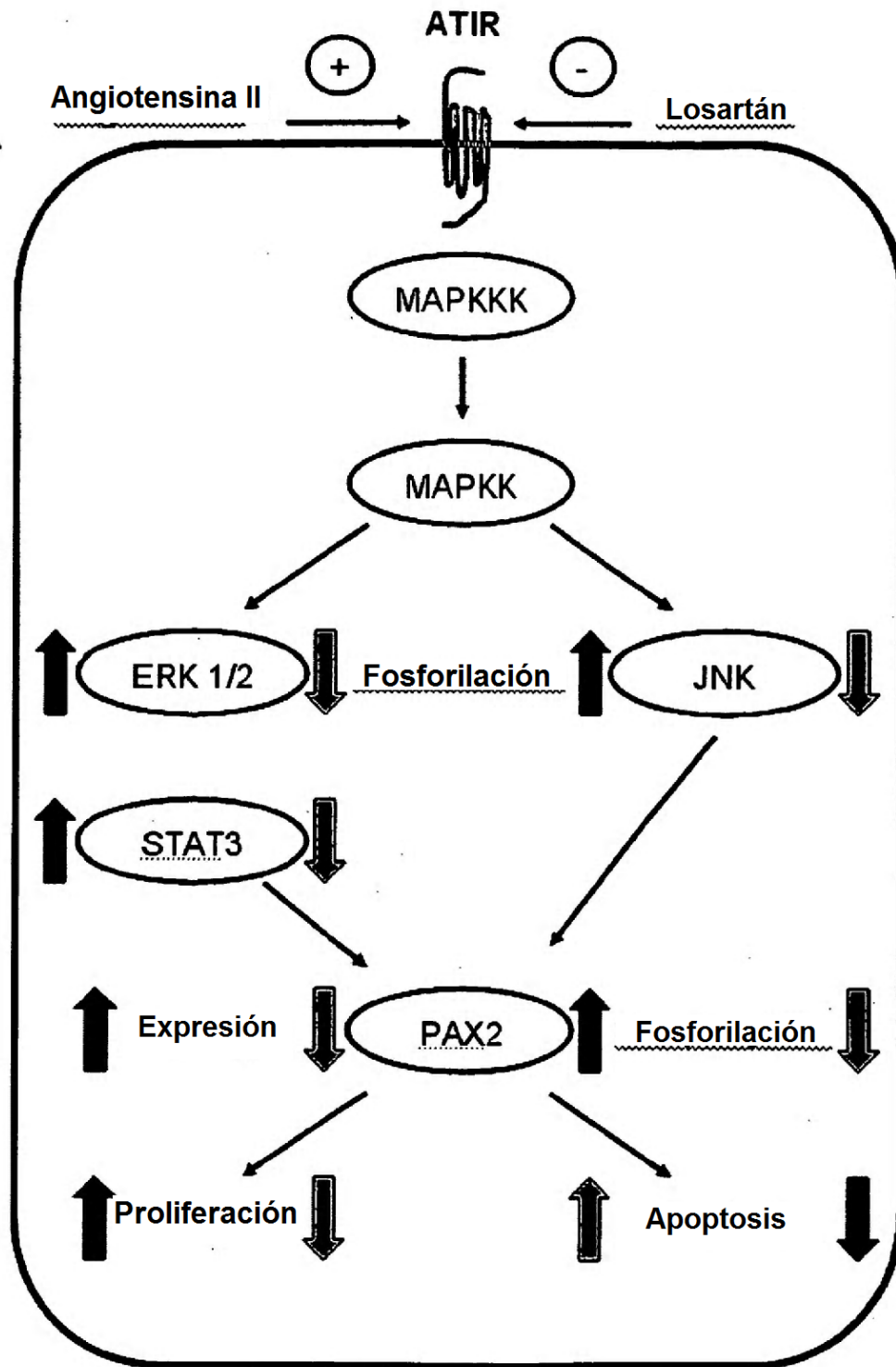


**FIG 24A**

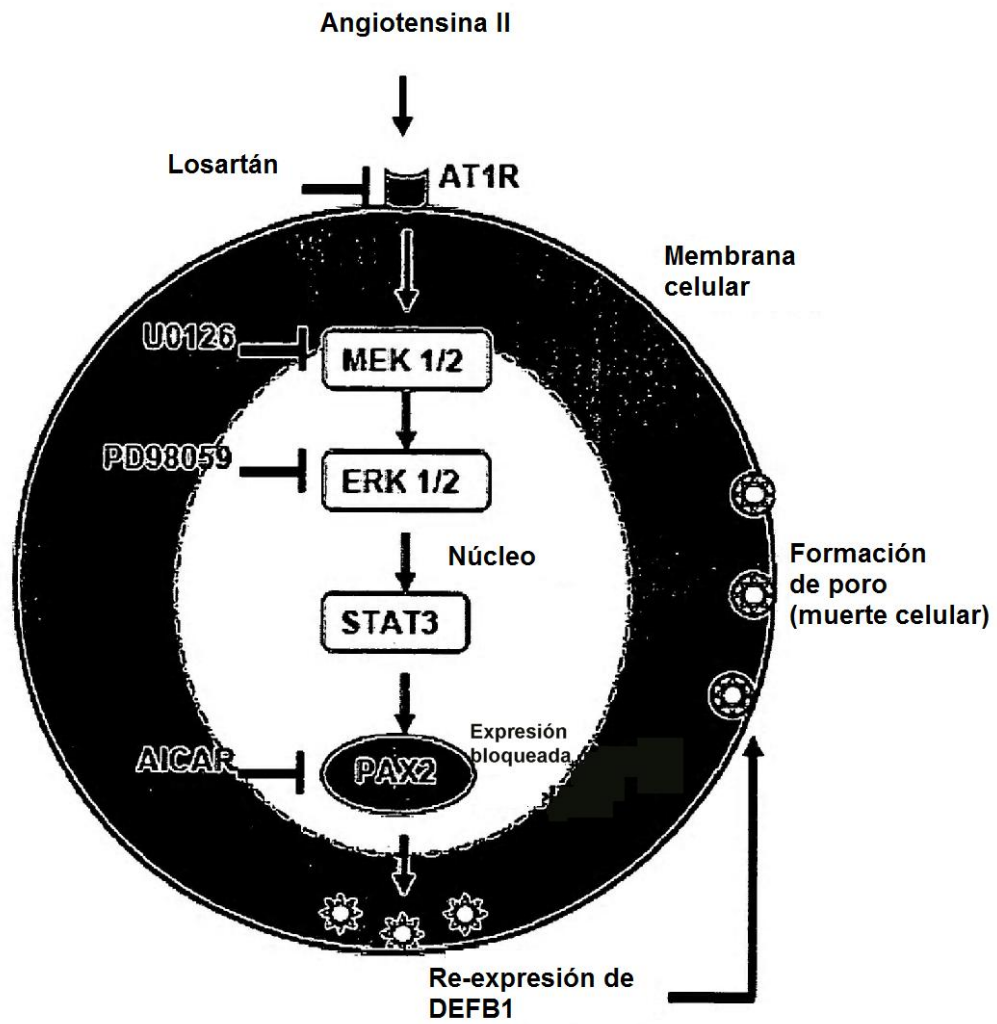


**FIG 24B**

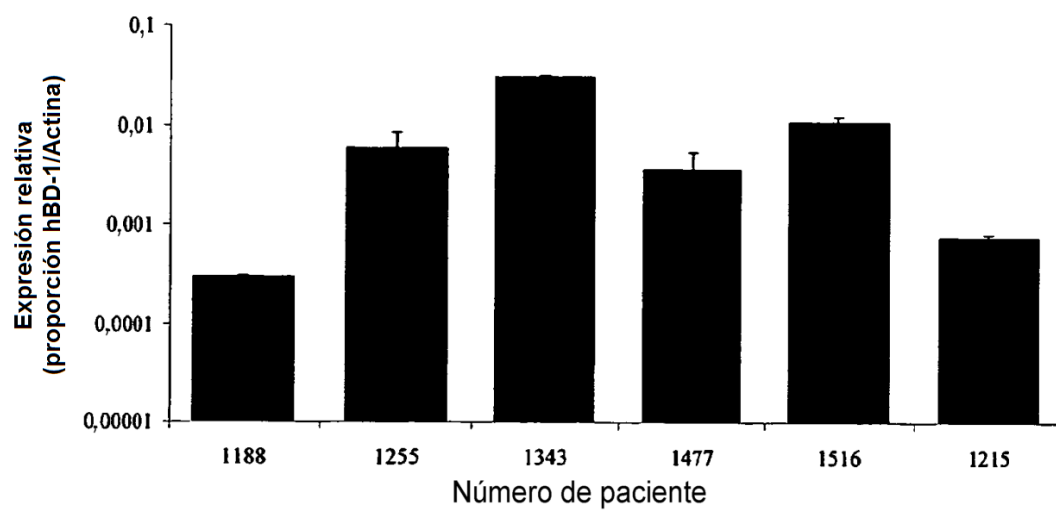
**FIG 25**



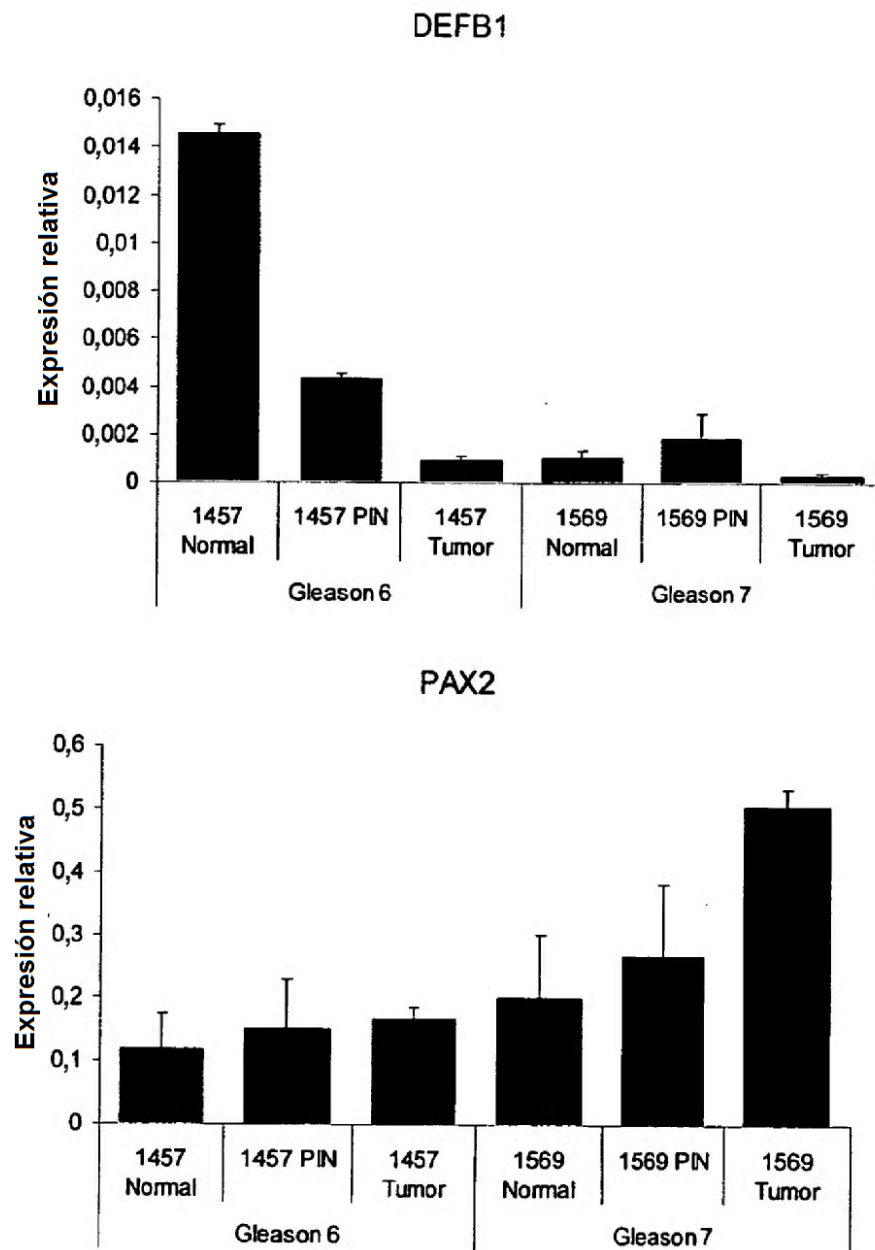
**FIG 26**



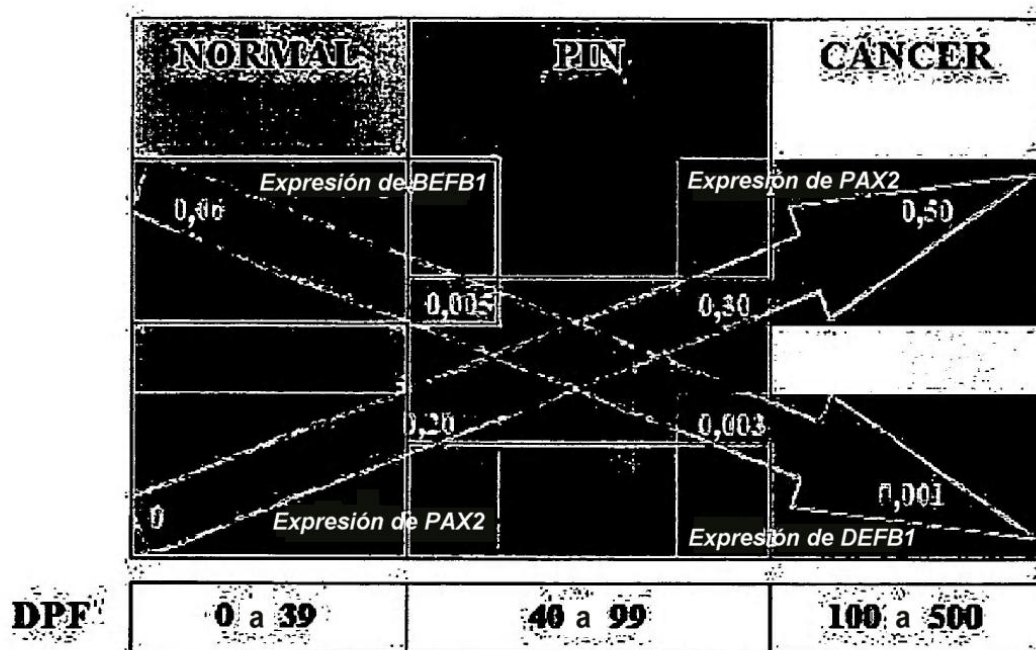
**FIG 27**



**FIG 28**

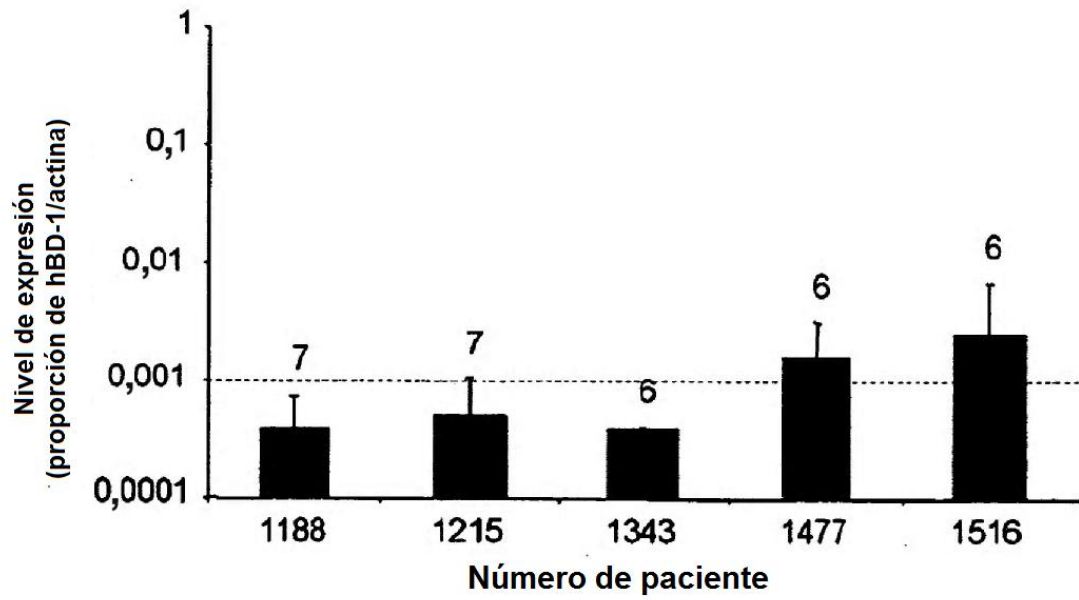


**FIG 29**

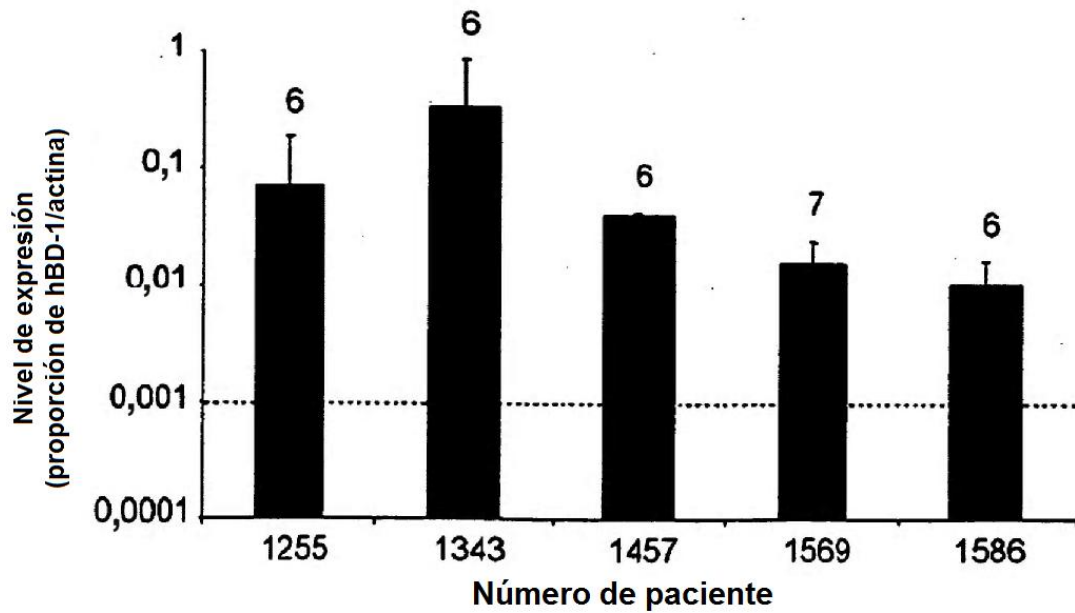


**FIG 30**

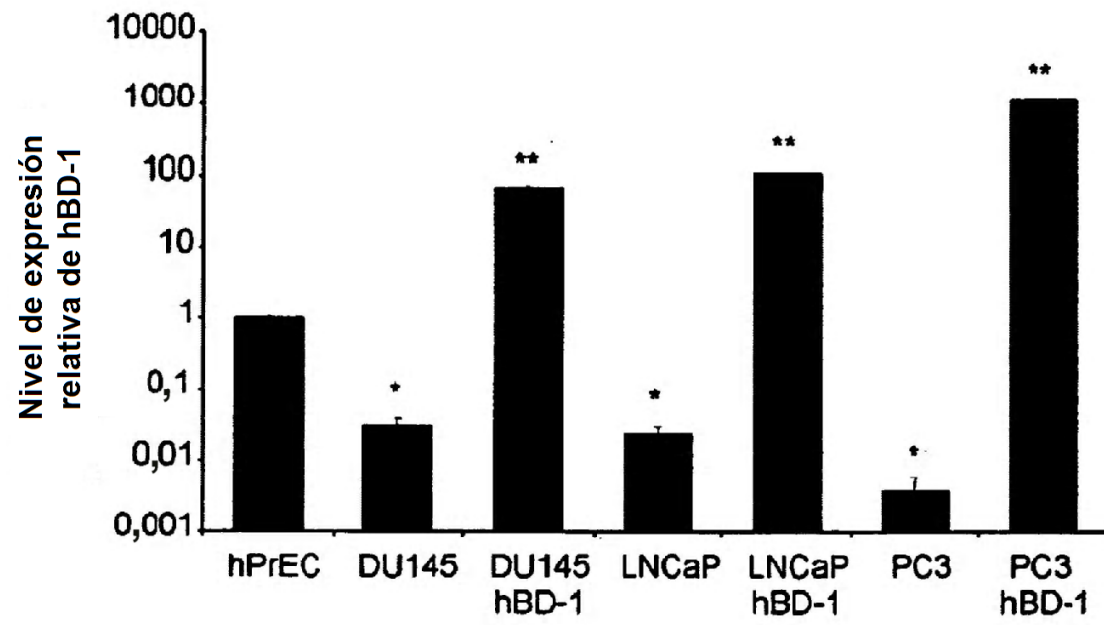




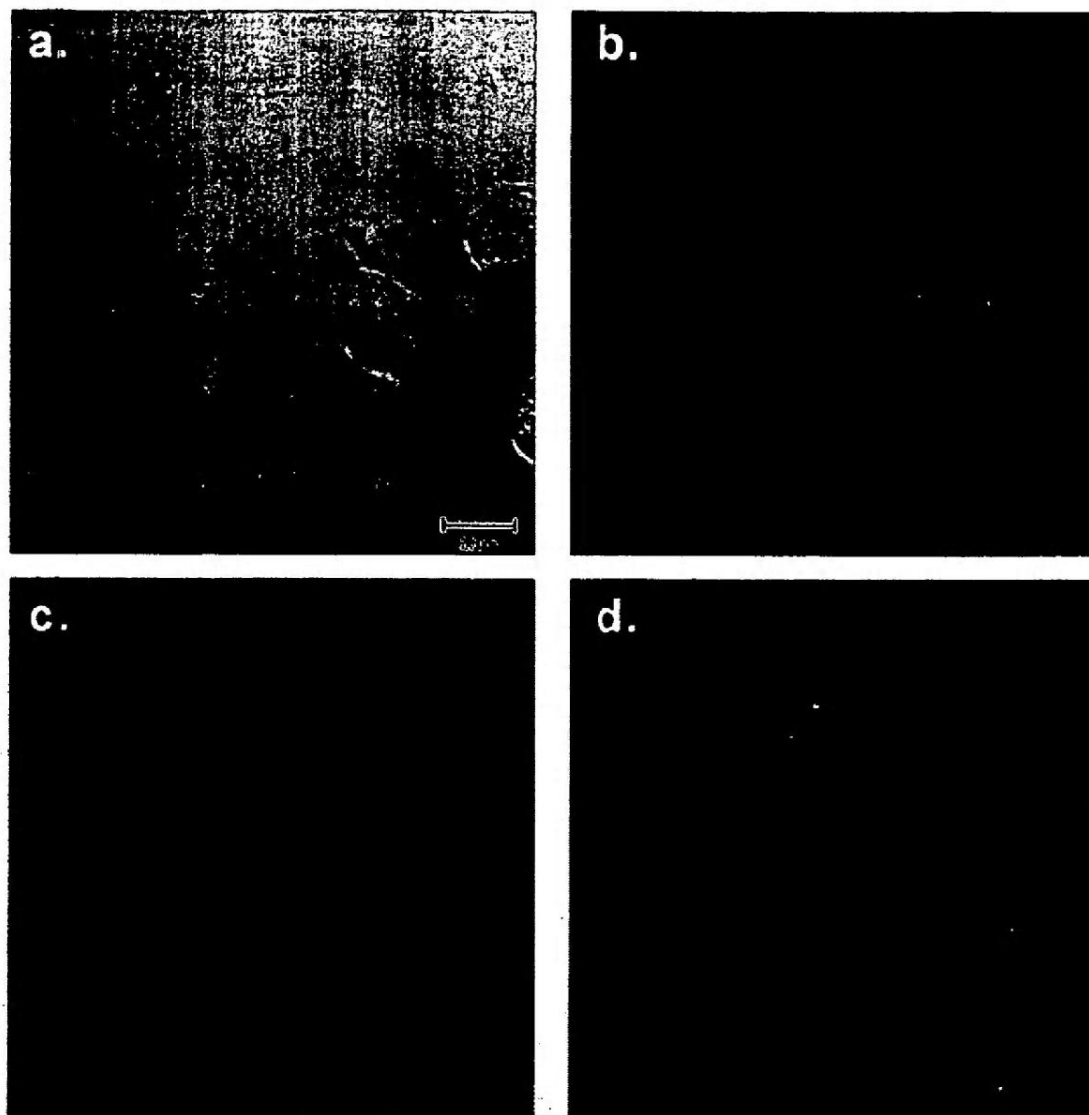
**FIG 31A**



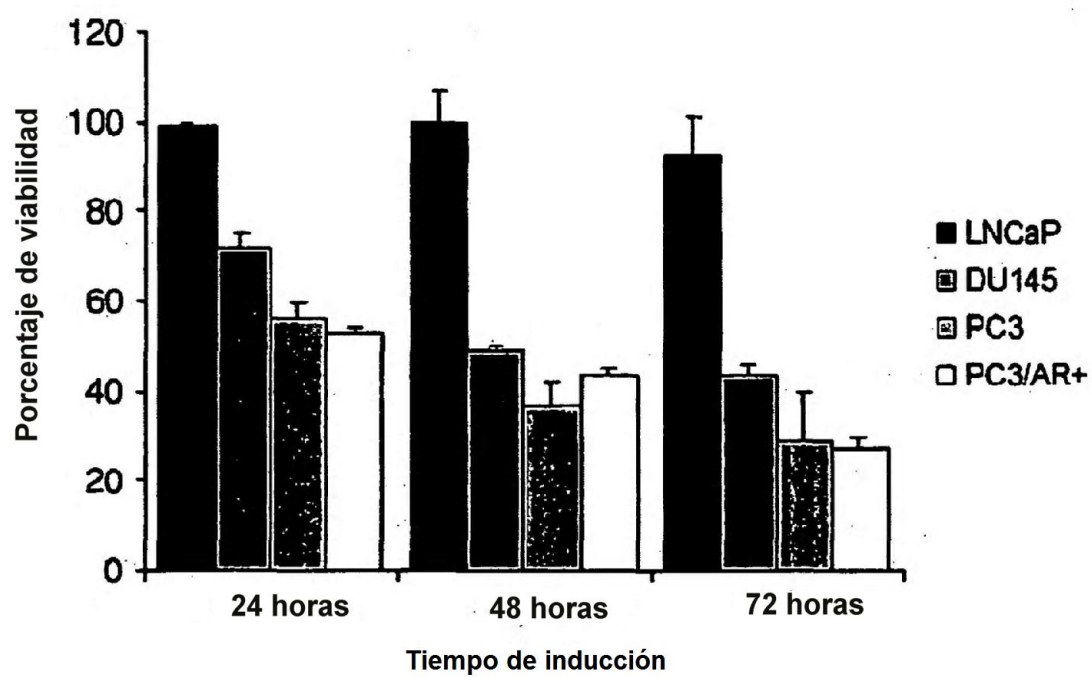
**FIG 31B**



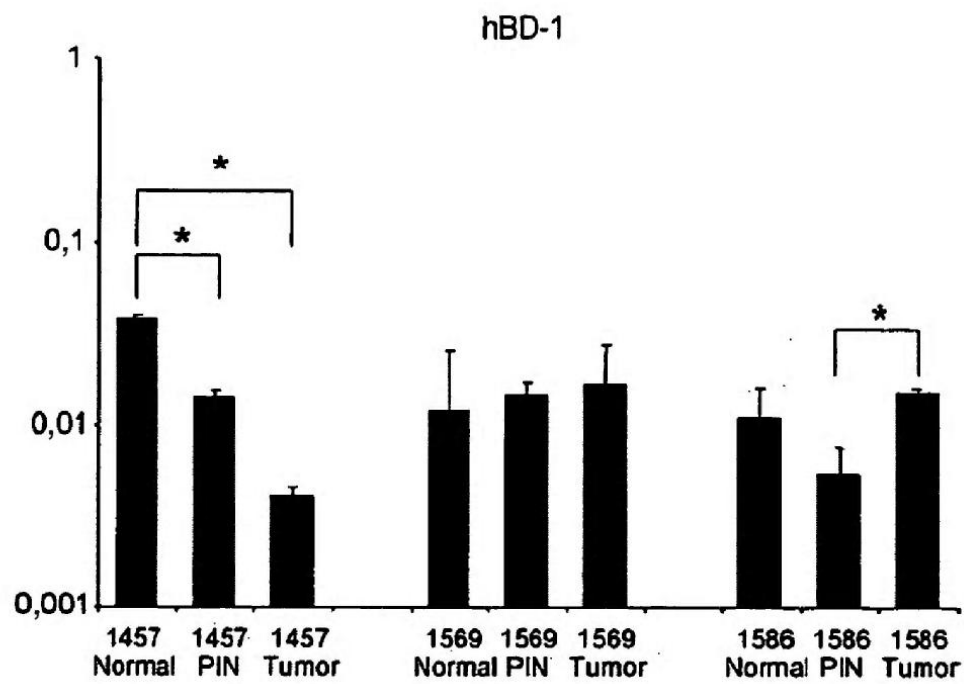
**FIG 32A**



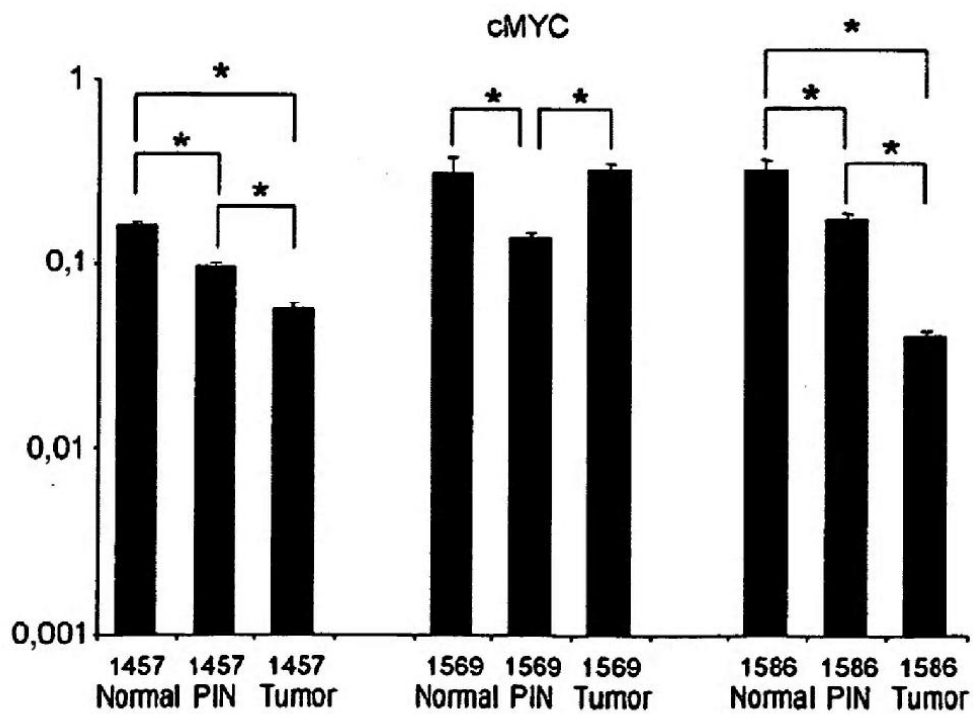
**FIG 32B**



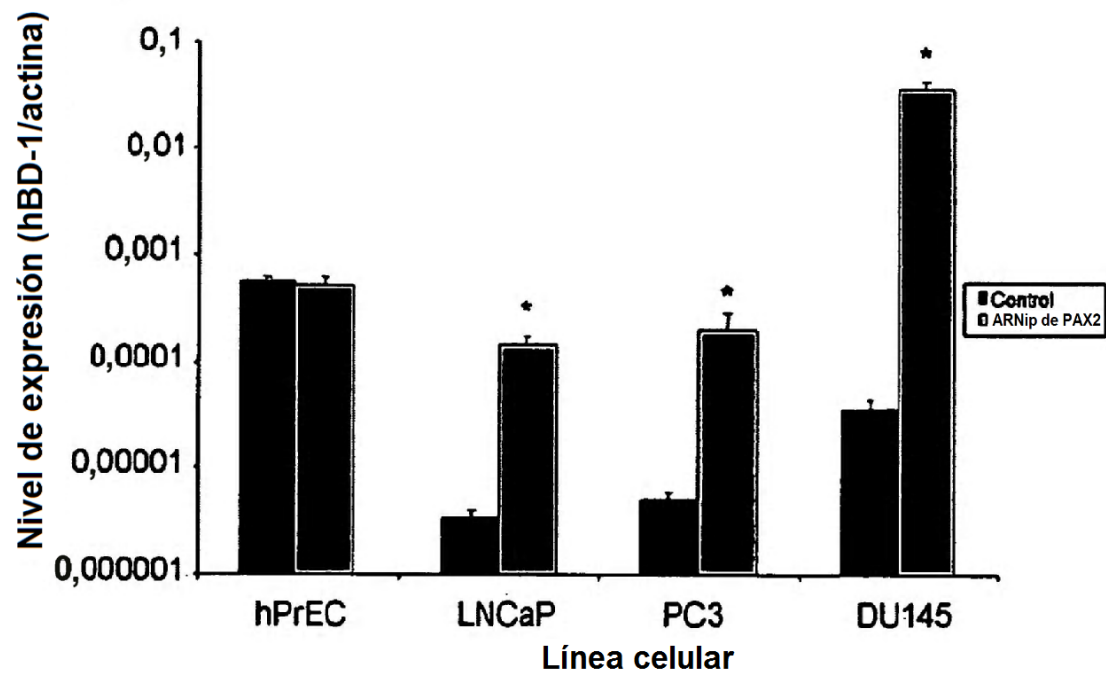
**FIG 33**



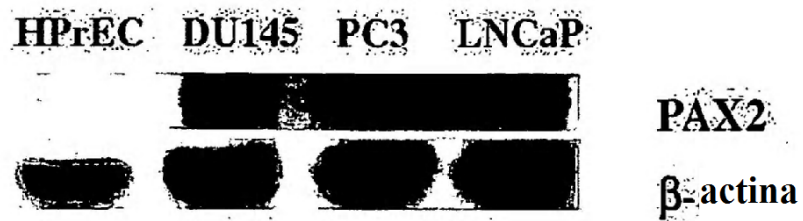
**FIG 34A**



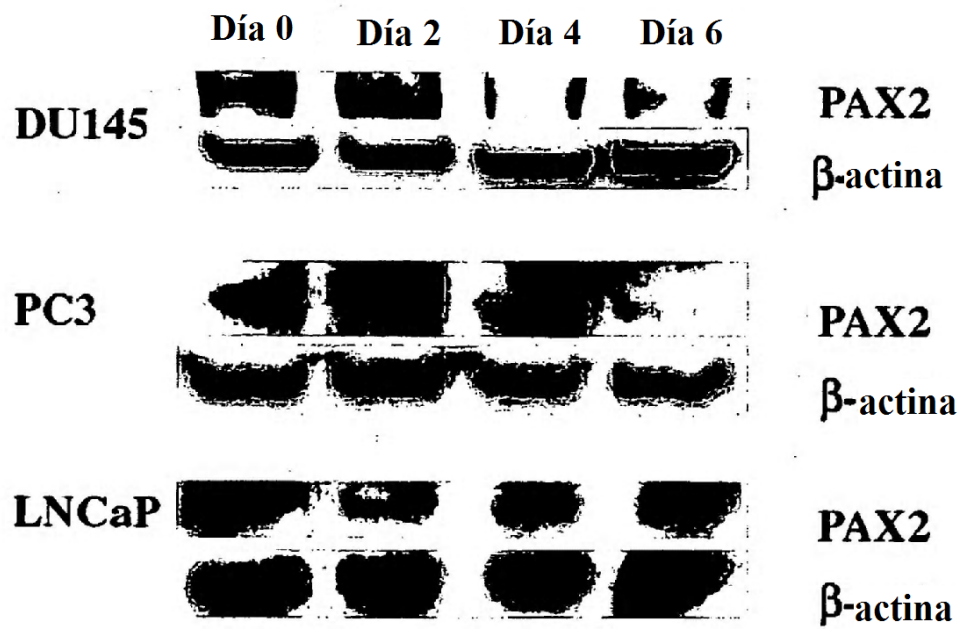
**FIG 34B**



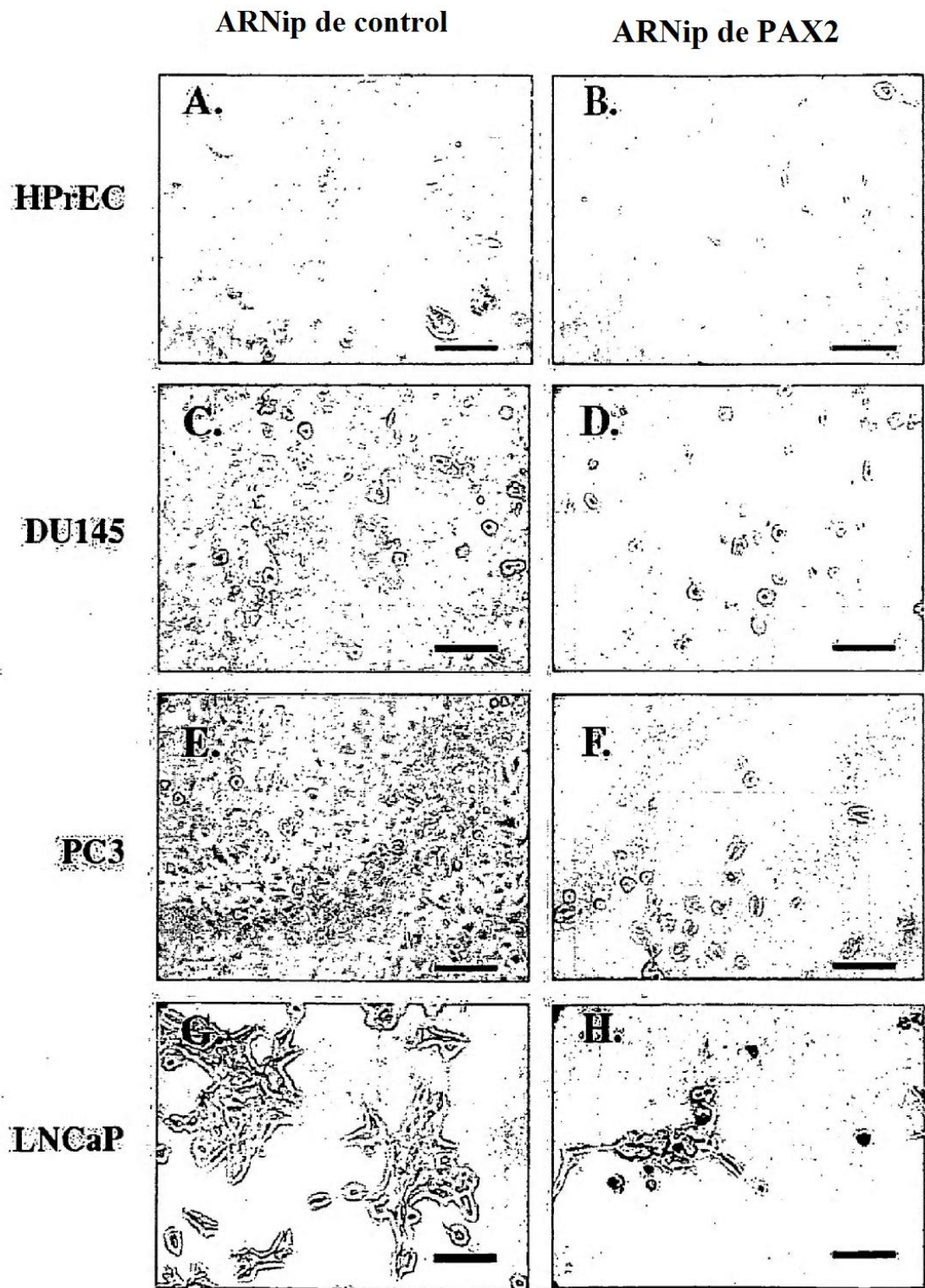
**FIG 35**



**FIG 36A**

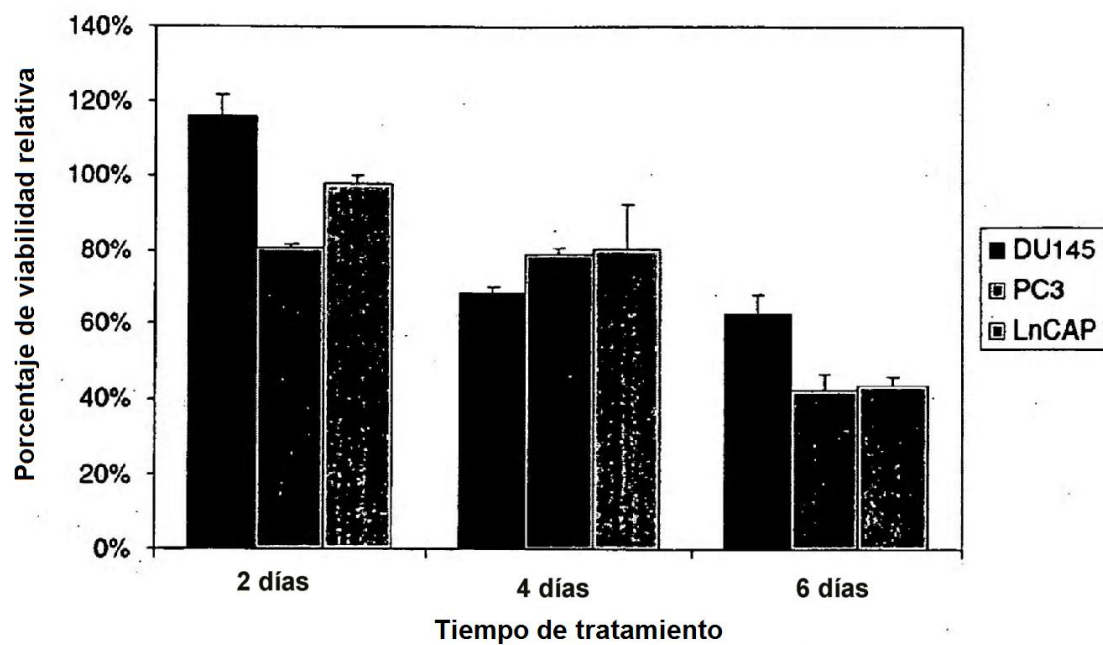


**FIG 36B**

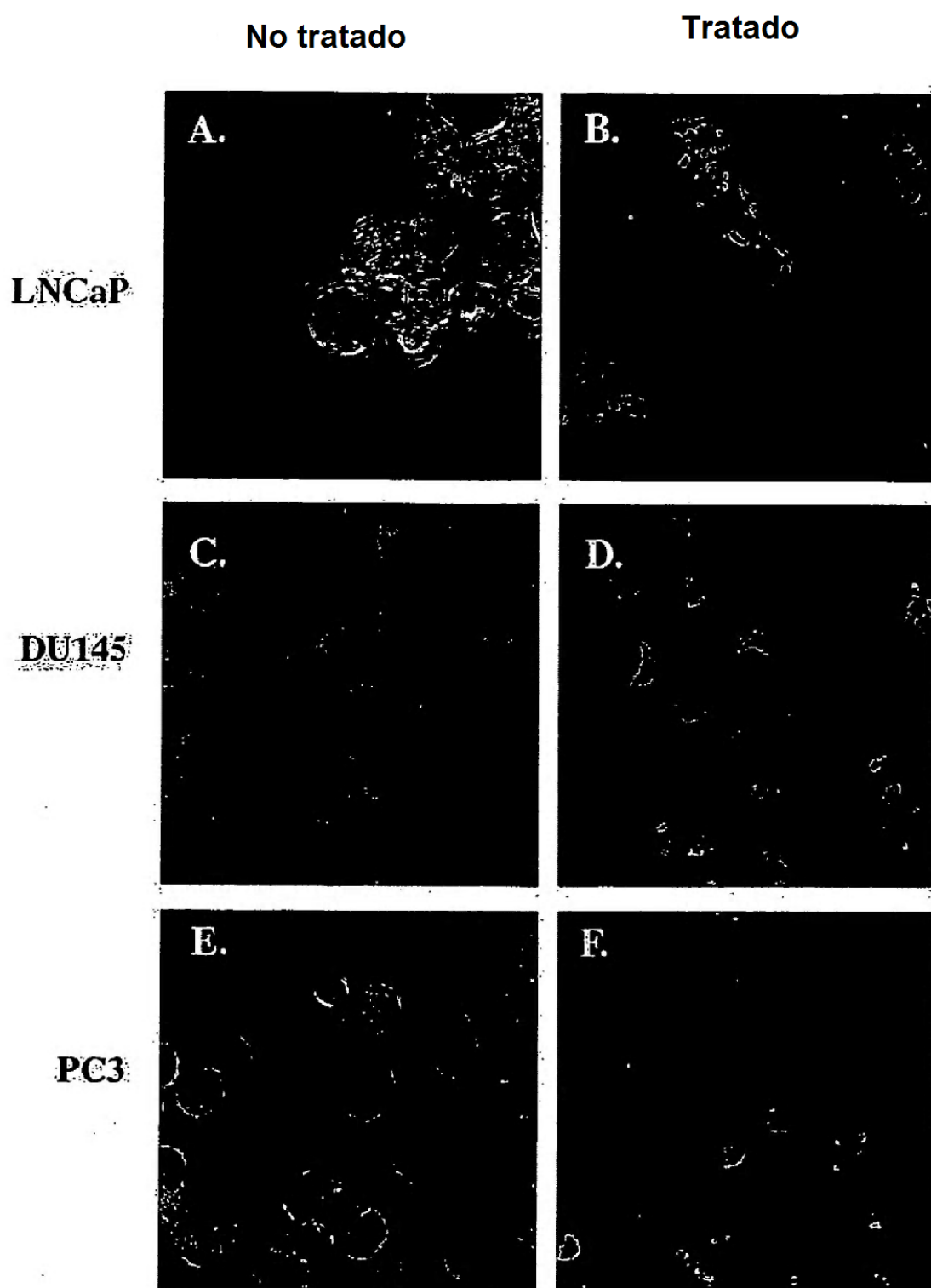


**FIG 37**

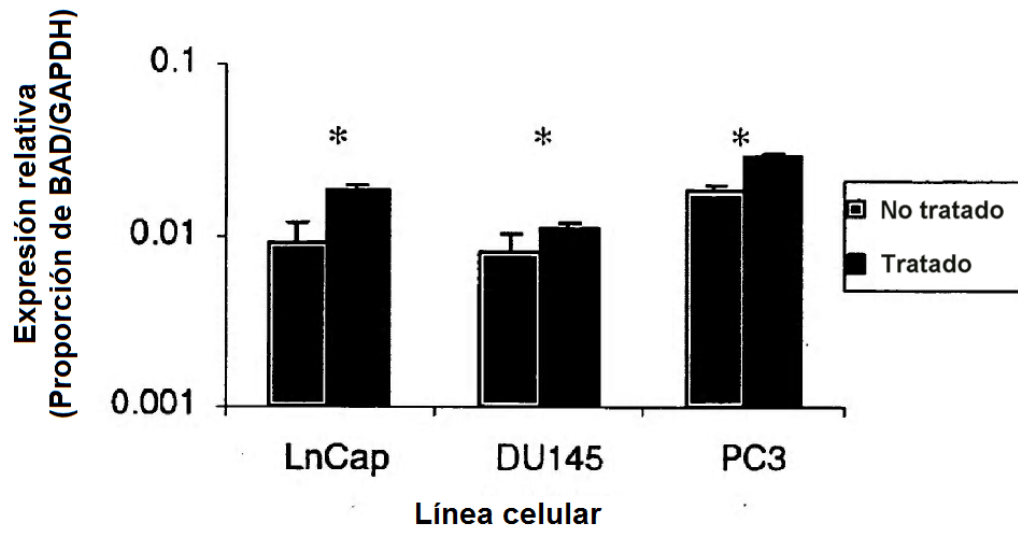




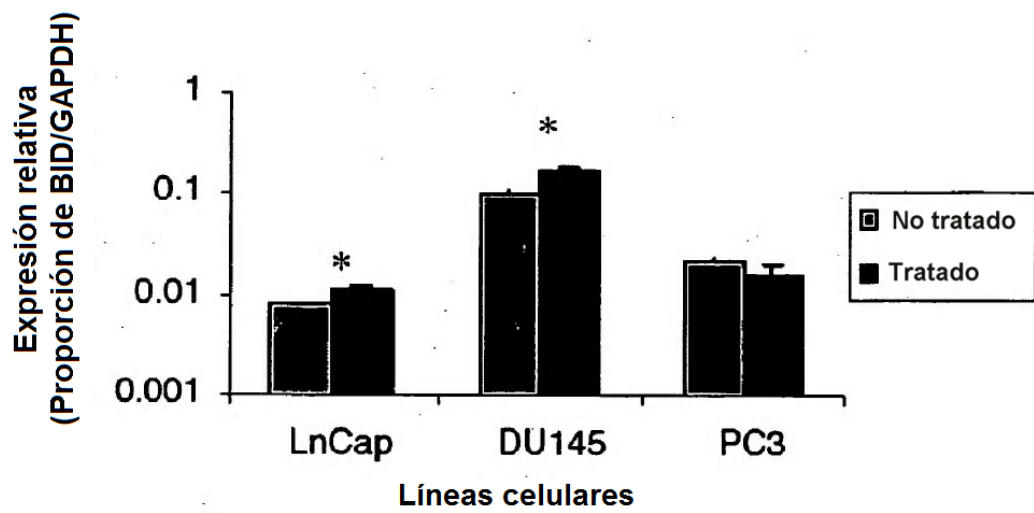
**FIG 38**



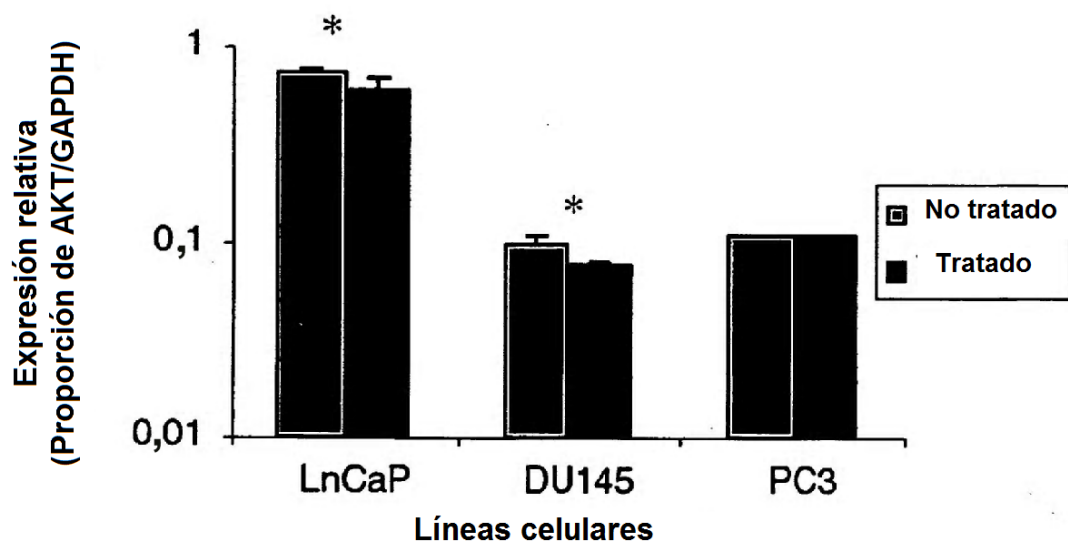
**FIG 39**



**FIG 40A**



**FIG 40B**



**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]
- US 6046319 A [0182]
- 15 • 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]
- 60
- 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]
- 65

- US 5624824 A [0187]
- US 5683873 A [0187]
- 5 • US 5728521 A [0187]
- US 5869248 A [0187]
- US 5877162 A [0187]
- WO 0244321 A [0189]
- 10 • US 4868116 A [0195]
- US 4980286 A [0195]
- WO 9002806 A [0195]
- 15 • WO 8907136 A [0195]
- US 6261834 B [0202]
- US 4897355 A [0208]
- US 6031071 A [0239]
- 20 • US 5824520 A [0239]
- US 5596079 A [0239]
- US 5084824 A [0243]
- 25 • US 5288514 A [0243] [0244]
- US 5449754 A [0243]
- US 5506337 A [0243] [0244]
- US 5539083 A [0243]
- 30 • US 5545568 A [0243]
- US 5556762 A [0243]
- US 5565324 A [0243]
- US 5573905 A [0243]
- 35 • 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]
- US 5942387 A [0243] [0244]
- US 5945070 A [0243]
- US 5948696 A [0243] [0244]
- US 5958702 A [0243]
- US 5958792 A [0243] [0244]
- US 5962337 A [0243] [0244]
- US 5965719 A [0243] [0244]
- US 5972719 A [0243] [0244]
- US 5976894 A [0243] [0244]
- US 5980704 A [0243]
- US 5985356 A [0243]
- US 5999086 A [0243]
- US 6001579 A [0243]
- US 6004617 A [0243]
- US 6008321 A [0243]
- US 6017768 A [0243] [0244]
- US 6025371 A [0243] [0244]
- US 6030917 A [0243]
- US 6040193 A [0243]
- US 6045671 A [0243]
- US 6045755 A [0243]
- 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]
- 55 • Fonsato V. et al. *Am J Pathol.*, 2006, vol. 168 (2), 706-1 [0075]
- 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]
- Bruggemann et al. *Year in Immunol.*, 1993, vol. 7,

65

- 5 • **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]
- 10 • **Ornstein, L.** *Disc electrophoresis*, L. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1964, vol. 121, 321349 [0105]
- **Laemmli, U.K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, 680 [0106]
- 15 • **D.M. Bollag et al.** Protein Methods. 1996 [0107]
- **E. Harlow ; D. Lane.** Antibodies, a Laboratory Manual. 1988 [0107]
- 20 • **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]
- 25 • **Neuhoff et al.** *Electrophoresis*, 1985, vol. 6, 427-448 [0112]
- **Neuhoff et al.** *Electrophoresis*, 1988, vol. 9, 255-262 [0112]
- 30 • **Voller, A. et al.** *J. Clin. Pathol.*, 1978, vol. 31, 507-520 [0116]
- 35 • **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]
- 40 • **Butler, J. E. et al.** Immunochimistry. Marcel Dekker, Inc, 1994, 759-803 [0116]
- Immunochimistry of Solid-Phase Immunoassay. CRC Press, 1991 [0116]
- 45 • 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]
- 50 • **Kohler ; Milstein.** *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0150]
- **Bernstein, E. et al.** *Nature*, 2001, vol. 409, 363-6 [0188]
- 55 • **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]
- 60 • **Elbashir, S.M. et al.** *Nature*, 2001, vol. 411, 494 498 33 [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]
- **Wolff, J. A. et al.** *Science*, 1990, vol. 247, 1465-1468 [0191]
- **Wolff, J. A.** *Nature*, 1991, vol. 352, 815-818 [0191]
- 10 • **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]
- 15 • **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]
- 20 • **Haj-Ahmad et al.** *J. Virology*, 1986, vol. 57, 267-274 [0198]
- **Davidson et al.** *J. Virology*, 1987, vol. 61, 1226-1239 [0198]
- 25 • **Zhang.** Generation and identification of recombinant adenovirus by liposome-mediated transfection and PCR analysis. *BioTechniques*, 1993, vol. 15, 868-872 [0198]
- 30 • **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]
- 60 • **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]
- **McKinaly ; Rossmann.** *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1989, vol. 29, 111-122 [0253]
- **Perry ; Davies.** QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design. Alan R. Liss, Inc, 1989, 189-193 [0253]
- 10 • **Lewis ; Dean.** *Proc. R. Soc. Lond.*, 1989, vol. 236, 125-140 141-162 [0253]
- **Askew et al.** *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, vol. 111, 1082-1090 [0253]
- 15 • **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]
- **Dawson et al.** *Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation*. *Science*, 1994, vol. 266, 776-779 [0268]
- 35 • **Baggiolini M et al.** *FEBS Lett.*, 1992, vol. 307, 97-101 [0268]
- **Clark-Lewis I et al.** *J.Biol.Chem.*, 1994, vol. 269, 16075 [0268]
- 40 • **Clark-Lewis I et al.** *Biochemistry*, 1991, vol. 30, 3128 [0268]
- **Rajaratnam 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 ; Prapotnich 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. ; Bolon, B. ; Goodyer, P. ; Eccles, Buttiglieri, S. ; Deregibus, 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. ; 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, 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]
- **Coultas, 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 ; Gazet 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.** Immunology. Versatile defensins. *Science*, 2002, vol. 298, 977-979 [0398]
- **Ganz, T.** Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *CR Biol.*, 2004, vol. 327, 539-549 [0398]
- **Eccles M.R. 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. ; Guillonnet, 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. *C R 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), 25 1-261 [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 • **Gropp, 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]
- **Guseva, N.V. et al.** Death receptor-induced cell death in prostate cancer. *J. Cell Biochem.*, 2004, vol. 91, 70-99 [0398]
- 30 • **Harder J ; Bartels J ; Christophers E ; Schroder JM.** A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, 26 June 1997, vol. 387 (6636), 861 [0398]
- 35 • **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]
- 40 • **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]
- 45 • **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]
- 50 • **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]
- 55 • **Hoon DS ; Sarantou T ; Doi F ; Chi DD ; Kuo C ; Conrad AJ ; Schmid P ; Turner R ; Guiliano A.** Detection of metastatic breast cancer by b-hCG polymerase chain reaction. *Int J Cancer*, 1996, vol. 69, 369-374 [0398]
- 60 • **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), 33314-20 [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- $\kappa$ 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 Casteele, 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]
- Khoubehi 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-B1 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]
- 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*, 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]
- **Meisse, D. ; Van de Castele, M. ; Beauloye, C. ; Hainault, I. ; Kefas, B. A. ; Rider, M. H. ; Foulle, 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]
- 15 • **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]
- 20 • **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]
- 25 • **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]
- 30 • **Nakamura, Y.** Isolation of p53-target genes and their functional analysis. *Cancer Sci.*, 2004, vol. 95 (1), 7-11 [0398]
- 35 • **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]
- 40 • **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]
- 45 • **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]
- 50 • **Noguchi S ; Aihara T ; Motomura K ; Inaji H ; Im-aoka 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]
- 55 • **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]
- **Robson, E.J. et al.** PANorama of PAX genes in cancer and development. *Nat. Rev. Cancer*, 2006, vol. 6 (1), 52-62 [0398]
- **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]
- **Sanyanusin P et al.** Genomic structure of the PAX2 gene. *Genomics*, 1996, vol. 35 (1), 258-261 [0398]
- **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]
- **Seiden MV ; Kantoff PW ; Krithivas K ; Probert 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]
- **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]
- **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]
- **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]
- **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]
- **Stambolic, V. et al.** Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*, October 1998, vol. 2 95 (1), 29-39 [0398]
- **Strasser, A.** The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005, vol. 5 (3), 189-200 [0398]
- **Stuart E T et al.** Mammalian Pax genes. *Annual Review of Genetics*, 1994, vol. 28 (219), 219-36 [0398]
- **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. ; 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, 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. ; Gommella, 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]
- 30 • **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 ; Irjala 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 Rlg-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]