

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 356**

51 Int. Cl.:

C07K 16/32 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2010** **E 14170995 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2019** **EP 2799453**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales de ERG2 y su uso terapéutico**

30 Prioridad:

29.04.2009 US 173834 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.09.2019

73 Titular/es:

**THE HENRY M. JACKSON FOUNDATION FOR
THE ADVANCEMENT OF MILITARY MEDICINE,
INC. (100.0%)
6720-A Rockledge Drive, Suite 100
Bethesda, MD 20817, US**

72 Inventor/es:

**SRIVASTAVA, SHIV;
TAN, SHYH-HAN y
DOBI, ALBERT**

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

ES 2 725 356 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales de ERG2 y su uso terapéutico

5 Declaración del interés del gobierno

La presente invención se realizó parcialmente con apoyo del gobierno de los Estados Unidos a partir de investigación financiada por el número de contrato HU0001-04-C-1502 de la Universidad de Ciencias de la Salud de los Servicios Uniformados y la subvención W81XWH-08-1-0532 de la Actividad de Adquisición de Investigación Médica del Ejército de los Estados Unidos. El Gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos en la invención.

Antecedentes

El proto-oncogén del gen relacionado con ETS (ERG) se sobreexpresa en el 60-70 % de los tumores de próstata como resultado de fusiones génicas recurrentes que implican a *TMPRSS2* y a la familia *ETS* de genes (Petrovics *et al.*, 2005; Tomlins *et al.*, 2005; revisado en Kumar-Sinha *et al.*, 2008). Se han descrito fusiones génicas recurrentes de genes regulados por andrógeno y genes de miembros de la familia *ETS* en cáncer de próstata. También se han proporcionado composiciones y métodos que tienen utilidad en el diagnóstico, investigación y terapia de cáncer de próstata (WO 2007/033187). Estudios emergentes sobre muestras de ensayo de cánceres de próstata humana y diversos modelos experimentales subrayan la función oncogénica causante de *ERG* en cáncer de próstata (Klezovitch *et al.*, 2008; Tomlins *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). Numerosos informes destacan las características tanto de diagnóstico como de pronóstico de la activación genómica de *ERG* revelando que aproximadamente la mitad de los tumores de próstata albergan la fusión génica más común que tiene lugar entre el promotor del gen *TMPRSS2* regulado por receptor de andrógenos y la secuencia codificante de la proteína ERG (revisado en Kumar-Sinha *et al.*, 2008). La fusión entre el promotor del gen *TMPRSS2* y *ERG* da como resultado la sobreexpresión de formas truncadas en el extremo N terminal o de longitud completa de ERG (Klezovitch *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2008). También se han identificado en cáncer de próstata acontecimientos de fusión entre *erg* y otras secuencias promotoras inducibles por andrógenos, tales como *SLC45A3* (Han *et al.*, 2008) y *NDRG1* (Pflueger *et al.*, 2009).

Se ha destacado el mal resultado de enfermedad para pacientes con tumores que albergan duplicaciones de fusiones *MPRSS2/ERG* o pérdidas cromosómicas (Edel) asociadas con el acontecimiento de fusión (Attard *et al.*, 2008; FitzGerald *et al.*, 2008; Mehra *et al.*, 2008). El diagnóstico actual de cáncer de próstata se basa en diversas características histológicas, incluyendo patrón de crecimiento arquitectónico, pérdida de células basales, atipia nuclear, citoplasma anfífilo, mucina azul intraluminal, secreción amorfa rosa y figuras mitóticas (Egevad, 2008). Si algunas de estas características no resultan evidentes, puede ser difícil para los patólogos diagnosticar el cáncer de próstata, especialmente en el caso de biopsias de aguja de próstata con contenido tumoral muy limitado (Mostofi *et al.*, 1992; Mostofi *et al.*, 1993). Se usan en la actualidad marcadores moleculares para ayudar al diagnóstico. Por ejemplo, el diagnóstico de cáncer de próstata puede incluir tinción de células basales de glándulas benignas para citoqueratina específica o p63 (CK903, p63) y alfa-metil-acil-CoA-Racemasa asociada con células tumorales (AMACR o P504S) (Luo *et al.*, 2002; Rubin *et al.*, 2002). Sin embargo, estos marcadores moleculares tienen limitaciones notables en el diagnóstico rutinario. Se encuentra expresión de AMACR en otras diversas lesiones no malignas, incluyendo hasta el 21 % de glándulas prostáticas benignas, 58 % de adenomas nefrogénicos y aproximadamente el 18 % de casos de hiperplasia adenomatosa atípica (Beach *et al.*, 2002; Gupta *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2002). Nuevos datos que evalúan la sobreexpresión de *ERG* y el reordenamiento genómico de *TMPRSS2/ERG* están proporcionando nuevas estrategias altamente prometedoras en diagnóstico y pronóstico de cáncer de próstata (Furusato *et al.*, 2008; Saramaki *et al.*, 2008).

Se han descrito fusiones de *EWS-ERG* en un subconjunto pequeño de sarcoma de Ewing, mientras que se ha destacado la sobreexpresión de ERG sin fusión en leucemia mieloide aguda y leucemia linfoblástica T aguda (Marcucci *et al.*, 2005; Baldus *et al.*, 2006). También se ha ligado la sobreexpresión de ERG a la leucemia megacarioblástica (Rainis *et al.* 2005). Otros estudios sugieren que el aumento de la expresión de ERG desempeña un papel en la Enfermedad de Alzheimer (EA) y neuropatía de tipo EA en Síndrome de Down (Shim *et al.*, 2003; Ng *et al.* 2010).

La estructura del gen *ERG* humano incluye al menos 17 exones que abarcan aproximadamente 300 kilobases de secuencia genómica y que generan al menos nueve transcritos separados (Owczarek *et al.*, 2004). Las isoformas *ERG1-ERG5* codifican cinco polipéptidos separados que pueden unirse con el sitio ETS y actuar como activadores transcripcionales (Owczarek *et al.*, 2004). De estas cinco isoformas, *ERG3* es la más larga, codificando un polipéptido de 479 aminoácidos (SEQ ID NO: 1; N.º de referencia NP_891548-1). Las isoformas *ERG6-ERG9* representan formas de corte y empalme alternativo con un exón 5' diferente de otras isoformas de *ERG*. Aunque *ERG7* y *ERG8* tienen fases abiertas de lectura, *ERG6* codifica múltiples codones de parada, lo que sugiere que este transcrito ERG no codifica una proteína funcional (Owczarek *et al.*, 2004). El transcrito de *ERG9* no contiene un codón de inicio potencial o una señal de poliadenilación consenso lo que sugiere que podría ser también un transcrito no codificante (Owczarek *et al.*, 2004).

Se han descrito anticuerpos inducidos contra ERG2 humano recombinante (Murakami *et al.*, 1993). Sin embargo, aunque el proto-oncogén *ERG* se caracterizó inicialmente hace más de veinte años (Rao *et al.*, 1987a; Rao *et al.*, 1987b; Reddy *et al.*, 1987), en la actualidad no hay ningún anticuerpo disponible para detectar ERG en muestras de ensayo clínicas. La proteína ERG pertenece a un grupo altamente homólogo de proteínas, la familia multigénica *ETS* (específica de E-veintiséis, específica de transformación de E26) de factores de transcripción, que están conservadas en todos los metazoos (Turner y Watson, 2008). Las proteínas de ETS contienen un dominio de unión a ADN hélice-vuelta-hélice alado y un dominio puntiagudo (SAM) implicado en la interacción proteína-proteína. El alto grado de homología entre miembros de esta familia presenta un obstáculo significativo para inducir un anticuerpo contra un miembro específico de esta familia de proteínas.

Aunque están disponibles en el mercado anticuerpos de ERG policlonales, estos anticuerpos muestran baja afinidad por niveles endógenos de la proteína ERG y altos niveles de tinción no específica que limitan su utilidad, por ejemplo, en ensayos de inmunohistoquímica. Como tales, los anticuerpos de ERG policlonales disponibles en el mercado no son adecuados para detectar proteínas ERG en situaciones clínicas (por ejemplo, en una biopsia tisular).

Sumario

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas y cualquier otro aspecto o realización expuestos en el presente documento son solamente para información.

La presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo que se une con el epítipo de ERG formado por los restos de aminoácidos 42-66 de la SEQ ID NO: 1 y comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada, en donde el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal que se une con un epítipo de ERG formado por los restos de aminoácidos 42-66 de la SEQ ID NO: 1 para su uso en el tratamiento de un tumor maligno en un sujeto, en donde el tumor maligno está provocado por un acontecimiento de fusión de *ERG* y/o sobreexpresión de *ERG*.

La presente divulgación proporciona anticuerpos que se unen con ERG humano y pueden usarse, por ejemplo, en métodos para detectar y tratar cánceres asociados con acontecimientos de fusión de ERG y/o sobreexpresión de ERG, tales como cáncer de próstata. Los anticuerpos muestran alta afinidad por ERG humano con de poca a ninguna tinción específica y por lo tanto son adecuados para detectar proteínas ERG en situaciones clínicas, incluyendo biopsias tisulares, sangre y orina.

Una realización se refiere a un anticuerpo monoclonal para su uso en el tratamiento de un tumor maligno que se une con ERG humano y, más específicamente, a un epítipo formado por la siguiente secuencia polipeptídica: GQTSKMSPRPVQQDWLSQPPARVTI, que corresponde a los restos de aminoácidos 42-66 de ERG3 humano (SEQ ID NO: 1) y se denomina en lo sucesivo en el presente documento el "epítipo ERG 42-66". En otra realización, el anticuerpo para su uso en el tratamiento de un tumor maligno es un anticuerpo monoclonal que se une con ERG humano, en el que la unión del anticuerpo con ERG3 humano (SEQ ID NO: 1) se inhibe de forma competitiva por un polipéptido que corresponde a los restos de aminoácidos 42-66 de ERG3 humano.

En una realización, el anticuerpo para su uso en el tratamiento de un tumor maligno es un anticuerpo monoclonal producido por el clon de hibridoma 9FY ("anticuerpo 9FY"). En otra realización, el anticuerpo para su uso en el tratamiento de un tumor maligno es un anticuerpo monoclonal que se une con el epítipo ERG 42-66 e inhibe de forma competitiva la unión del anticuerpo 9FY con ERG3 humano.

En otras realizaciones, el anticuerpo monoclonal para su uso en el tratamiento de un tumor maligno es humanizado, quimerizado o completamente humano. En un aspecto, el anticuerpo monoclonal para su uso en el tratamiento de un tumor maligno comprende las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las regiones variables de cadena ligera y pesada de un anticuerpo de ERG no humano que se une con el epítipo ERG 42-66, que se unen con las regiones marco conservadas (FR) de las regiones variables de cadena ligera y pesada de un anticuerpo humano, y opcionalmente se unen con las regiones constantes de cadena ligera y pesada de un anticuerpo humano. En una realización, el anticuerpo monoclonal para su uso en el tratamiento de un tumor maligno se une con el epítipo ERG 42-66 y comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende las tres CDR en SEQ ID NO: 2 y un dominio variable de cadena pesada que comprende las tres CDR en SEQ ID NO: 3. Este anticuerpo humanizado conserva la especificidad de antígeno de ERG del anticuerpo parental, pero es menos inmunogénico en un sujeto humano.

En otro aspecto, el anticuerpo para su uso en el tratamiento de un tumor maligno es un anticuerpo monoclonal quimérico. El anticuerpo quimérico contiene las regiones variables de cadena ligera y pesada de un anticuerpo de ERG no humano que se une con el epítipo ERG 42-66, que se unen opcionalmente con las regiones constantes de cadena ligera y pesada de un anticuerpo humano. Este anticuerpo quimérico conserva la especificidad de antígeno

de ERG del anticuerpo parental, pero es menos inmunogénico en un sujeto humano. En una realización, el anticuerpo monoclonal para su uso en el tratamiento de un tumor maligno se une con el epítipo ERG3 42-66 y comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

También se contempla un anticuerpo de ERG completamente humano para su uso en el tratamiento de un tumor maligno que se une con el epítipo ERG 42-66.

Los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento que se unen con el epítipo ERG 42-66 pueden usarse en diversas aplicaciones de investigación y médicas. Por ejemplo, la divulgación proporciona composiciones que comprenden uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento que se unen con el epítipo ERG 42-66 y su uso para detectar o tratar cánceres o afecciones patológicas asociadas con un acontecimiento de fusión de ERG o sobreexpresión de ERG, incluyendo, por ejemplo, cáncer de próstata, sarcoma de Ewing, leucemia mieloide aguda, leucemia megacarioblástica, cáncer endotelial, y leucemia linfoblástica T aguda. También pueden usarse anticuerpos monoclonales que se unen con el epítipo ERG 42-66 para detectar ERG humano o una proteína de fusión que comprende todo o parte de un polipéptido de ERG humano, tal como una proteína ERG codificada por un transcrito de fusión *TMPRSS2/ERG*, en una muestra biológica.

Se describen además composiciones que comprenden el polipéptido ERG 42-66, en el que la composición comprende además un adyuvante y/o un hapteno, tal como KLH, acoplado con el polipéptido ERG 42-66. Estas composiciones pueden usarse, por ejemplo, en un método para producir anticuerpos. El método comprende administrar la composición a un mamífero no humano, incluyendo pero sin limitación a un ratón o conejo. El método puede comprender además aislar linfocitos B del mamífero no humano, immortalizar los linfocitos B para crear una línea celular capaz de producir un anticuerpo monoclonal y seleccionar el anticuerpo monoclonal que se une con el epítipo ERG 42-66.

Se describen además polinucleótidos aislados que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican las secuencias de aminoácidos de uno o más de los CDR de las regiones variables de cadena ligera y/o pesada de un anticuerpo monoclonal descrito en el presente documento que se une con el epítipo ERG 42-66, incluyendo, por ejemplo, el anticuerpo 9FY. La invención proporciona polinucleótidos aislados que comprenden secuencias de ADN que codifican las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena ligera y/o pesada de un anticuerpo monoclonal descrito en el presente documento que se une con el epítipo ERG 42-66, incluyendo el anticuerpo 9FY.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A muestra que el anticuerpo 9FY detecta la proteína ERG endógena codificada por el transcrito de fusión *TMPRSS2/ERG3* (50-52 kDa) en inmunotransferencias de células VCaP que albergan la fusión *TMPRSS2/ERG3*, expresado en respuesta a tratamiento con hormona andrógena sintética (R1881) (carriles 4-6). El anticuerpo 9FY no muestra inmunorreactividad a células LNCaP que no albergan una proteína de fusión *TMPRSS2/ERG* (carriles 1-3). En los paneles inferiores, se muestra la expresión dependiente de dosis de hormona de la proteína (SLC45A3) y PSA (KLK3). **La Figura 1B** muestra que el ARNip de ERG inhibe la expresión de ERG en células VCaP tratadas con R1881.

La Figura 2A muestra que el anticuerpo 9FY reconoce el polipéptido inmunizador en un ensayo de ELISA. Se sembraron en placas diversas concentraciones del polipéptido inmunizador y dos polipéptidos de control en pocillos para ELISA y se exploraron con una dilución 1:10.000 del anticuerpo 9FY. El eje Y indica los valores de absorbancia a 450 nm. En el eje X se muestra la concentración log 10 del polipéptido inmunizador ERG y polipéptidos de control en ng/ml. **La Figura 2B** muestra que el polipéptido inmunizador compite con la proteína ERG3 por la unión del anticuerpo 9FY. En el ensayo de ELISA tipo sándwich, se sembraron lisados de proteína ERG3 en placas de formato multipocillo y se ensayaron con diversas concentraciones de anticuerpo 9FY en presencia (barra blanca) o ausencia de polipéptido inmunizador (barra sombreada). El factor de dilución se marca en el eje X. Los valores de titulación del anticuerpo se marcan por barras sombreadas.

La Figura 3 muestra que el anticuerpo 9FY reconoce e inmunoprecipita la proteína ERG de sitios diana genómicos como se muestra por ensayo de inmunoprecipitación de cromatina *in vivo* (ChIP). Se transfectaron células VCaP tratadas con R1881 por ARNip de *ERG* (ip) para anular ERG o por ARNip no dirigido (NT) de control. Las células se procesaron para ensayo de ChIP y la cromatina se inmunoprecipitó usando anticuerpo 9FY. En células transfectadas con control (NT) se recluta proteína ERG a secuencias diana genómicas *HPGDH*, *C-MYC*, *KLK3* (PSA) y *SLC45A3* (proteína). La anulación de ERG reduce fuertemente el reclutamiento de ERG a los sitios diana genómicos. Se usaron amplicones de ADN genómicos de entrada como controles para el ensayo de ChIP.

La Figura 4 muestra que el anticuerpo 9FY reconoce específicamente la proteína ERG endógena en un ensayo de inmunofluorescencia (IF). ERG se tiñe por el anticuerpo 9FY primario seguido de anticuerpo secundario ALEXA FLUOR® 594 anti-ratón de cabra (Invitrogen, Carlsbad, CA) (rojo). El PSA inducible por andrógeno que se controla negativamente por ERG está teñido por anti-PSA policlonal de conejo primario seguido de anticuerpo secundario ALEXA FLUOR® 488 anti-conejo de cabra (Invitrogen, Carlsbad, CA) (verde). El ADN se tiñe por DAPI (azul). Las imágenes mezcladas en las columnas de la derecha muestran localización nuclear de ERG. **La Figura 4A** muestra que la anulación de ERG con ARNip de *ERG* elimina ERG y tinción del anticuerpo 9FY

nuclear de células VCaP tratadas con R1881. La expresión de PSA citoplasmática es coherente con la inducción hormonal de células VCaP. **La Figura 4B** muestra que el polipéptido inmunizador (péptido de competición) elimina la tinción de ERG con el anticuerpo 9FY. Por el contrario, un polipéptido de control (péptido no competidor) no afecta a la tinción de anticuerpo 9FY. **La Figura 4C** muestra que el anticuerpo 9FY detecta la activación robusta de expresión de ERG en respuesta a hormona andrógena (R1881) en células VCaP que albergan fusión *TMPRSS2/ERG* pero no en células LNCaP que no expresan ERG endógeno. **La Figura 4D** muestra que la tinción de anticuerpo 9FY se reduce en células VCaP en respuesta a anulación de ERG con ARNip de *ERG*. La expresión de PSA aumenta en respuesta a anulación de *ERG*, lo que es coherente con el papel regulador negativo de ERG en la expresión de PSA. El anticuerpo 9FY detecta ERG incluso en los intervalos de factor de dilución de 1:5.000 a 1:20.000 de la solución de reserva de anticuerpo 9FY de 3,7 mg/nl. **La Figura 4E** muestra que la realización de un ensayo IF en ausencia de anticuerpo 9FY y en presencia del anticuerpo secundario no produce tinción de fondo.

La Figura 5 muestra que el anticuerpo 9FY tiñe específicamente células epiteliales tumorales prostáticas en muestras de ensayo de prostatectomía radical de próstata humana incluidas en parafina fijadas con formalina (FFPE) ensayadas por inmunohistoquímica (IHC). **La Figura 5A** muestra campos de visión representativos de secciones de próstata teñidas con anticuerpo 9FY. La distinción superior entre epitelio de tumor de próstata y epitelio benigno es evidente en IHC. La falta de tinción del estroma prostático también es evidente. Los endotelios vasculares que expresan ERG de tipo silvestre se tiñen por anticuerpo 9FY y presentan una excelente referencia interna para la función apropiada del anticuerpo 9FY. **La Figura 5B** muestra una vista de alta ampliación de una sección de FFPE y la tinción clara de epitelio de tumor de próstata por el anticuerpo 9FY. **La Figura 5C** muestra la vista panorámica de tinción de ERG por anticuerpo 9FY en una sección de muestra de ensayo de prostatectomía radical de próstata humana incluida en parafina fijada con formalina (FFPE). **La Figura 5D** muestra la tinción de la sección por hematoxilina y eosina correspondiente.

La Figura 6 muestra que la proteína ERG expresada de forma endógena se detecta por anticuerpo 9FY en líneas celulares derivadas de cáncer colon (COLO320), leucemia mieloide aguda (KG1) y leucemia linfoblástica T aguda humana (MOLT4) usando ensayo de inmunotransferencia.

La Figura 7 muestra que el anticuerpo 9FY detecta específicamente proteína ERG sobreexpresada de forma exógena codificada por un transcrito de fusión *TMPRSS2/ERG* en inmunotransferencias, mientras que los anticuerpos policlonales disponibles en el mercado detectan múltiples proteínas en los mismos lisados celulares. Se cargaron 20 µg de lisados celulares HEK293 de control transfectados con vectores vacíos en los carriles 1, 4 y 7; se cargaron 4 µg y 20 µg de lisados de células HEK293 transfectadas con pIRES-*TMPRSS2-ERG3* en los carriles 2, 5 y 8, y los carriles 3, 6 y 9, respectivamente.

La Figura 8A muestra que los anticuerpos policlonales H95 (sc-28680) detectan múltiples bandas no específicas en lisados celulares LNCaP y VCaP. Se trataron células LNCaP y VCaP con (carriles 2, 3, 5 y 6) o sin (carriles 1 y 4) la hormona andrógena sintética (R1881). **La Figura 8B** muestra la unión no específica de anticuerpos H95 con proteínas desconocidas en células VCaP tratadas con ARNip de *ERG* y/o ARN no dirigido (NT). En ausencia de ARNip de *ERG*, los anticuerpos H95 no parecen detectar la expresión de ERG. Además, los anticuerpos H95 no permiten observar la inhibición de la expresión de ERG por ARNip de *ERG*.

Las Figuras 9A y B muestran que los anticuerpos policlonales C-20 disponibles en el mercado (sc-353) reconocen no solamente proteína ERG nuclear sino también proteínas citoplasmáticas no específicas en un ensayo de IF.

La Figura 10 muestra que los anticuerpos policlonales H95 disponibles en el mercado (sc-28680) muestran tinción nuclear y citoplasmática no específica en células tanto VCaP como LNCaP en un ensayo de IF.

La Figura 11 muestra que los anticuerpos policlonales R20 disponibles en el mercado (sc-18136) muestran tinción nuclear y citoplasmática no específica en células tanto VCaP como LNCaP en un ensayo de IF.

La Figura 12 muestra los resultados de un ensayo de IF competitivo en células VCaP entre el anticuerpo 9FY (ERG-MAb) y los anticuerpos policlonales H95 disponibles en el mercado (sc-28680).

La Figura 13 muestra que el anticuerpo 9FY detecta productos de oncoproteína ERG codificados por variantes de corte y empalme comunes de fusiones *TMPRSS2-ERG*. Específicamente, el anticuerpo 9FY reconoció productos de oncoproteína ERG codificados por: ADNc de tipo A de fusión *TMPRSS2-ERG* (carriles 2 y 3), ADNc de *ERG3* de tipo silvestre (carril 4) y ADNc de tipo A de fusión *TMPRSS2-ERG8* (carril 5).

La Figura 14 muestra los resultados de un análisis de inmunohistoquímica comparativo entre el anticuerpo 9FY y el anticuerpo C20 disponible en el mercado (sc353) (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA) en tejidos de próstata obtenidos de ratones transgénicos para ERG y de tipo silvestre. **Las Figuras 14A y 14C** muestran tinción con el anticuerpo 9FY en tejido de próstata de tipo silvestre y transgénico para ERG, respectivamente. Las flechas sólidas marcan glándulas prostáticas y las flechas discontinuas indican células endoteliales. **Las Figuras 14B y 14D** muestran los patrones de tinción del anticuerpo C20 disponible en el mercado (sc 353) en tejido de próstata de tipo silvestre y transgénico para ERG, respectivamente.

La Figura 15 muestra una representación esquemática de la expresión de oncoproteína ERG (IHC) y ARNm de fusión *TMPRSS2-ERG* en tumores de próstata de 35 pacientes tratados con prostatectomía radical usando un ensayo de ADN de cadena ramificada. Se usaron portaobjetos de tejido consecutivo de muestras de ensayo de próstata FFPE montadas completas para los dos ensayos a ciegas. Los triángulos marcados con una barra inversa representan tinción de oncoproteína ERG positiva, mientras que los triángulos marcados con una barra representan la detección de ARNm de fusión *TMPRSS2-ERG*. Los triángulos huecos indican muestras de ensayo sin oncoproteína ERG o con transcrito de fusión *TMPRSS2-ERG* no detectable.

Descripción detallada

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas y cualquier otro aspecto o realización expuestos en el presente documento son solamente para información.

1. Definiciones

Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, se definen en primer lugar ciertos términos. Se exponen a lo largo de la descripción detallada definiciones adicionales.

El término “**anticuerpo**” como se usa en esta divulgación se refiere a una inmunoglobulina o un fragmento de unión a antígeno de la misma. El término incluye pero sin limitación anticuerpos policlonales, monoclonales, mono-específicos, poliespecíficos, no específicos, humanizados, humanos, monocatenarios, quiméricos, sintéticos, recombinantes, híbridos, mutados, insertados y generados *in vitro*. El anticuerpo puede incluir una región constante, o una parte de la misma tal como los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon y mu. Por ejemplo, pueden usarse regiones constantes de cadena pesada de los diversos isotipos, incluyendo: IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgM, IgA₁, IgA₂, IgD e IgE. Como ejemplo, la región constante de cadena ligera puede ser kappa o lambda.

Las expresiones “**dominio de unión a antígeno**” y “**fragmento de unión de antígeno**” se refieren a una parte de una molécula de anticuerpo que comprende aminoácidos responsables de la unión específica entre el anticuerpo y el antígeno. Para ciertos antígenos, el dominio de unión a antígeno o fragmento de unión a antígeno puede unirse solamente con una parte del antígeno. La parte del antígeno que se reconoce específicamente y se une con el anticuerpo se denomina el “epítipo” o “determinante antigénico”. Los dominios de unión a antígeno y fragmentos de unión a antígeno incluyen Fab (Fragmento de unión a antígeno); un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que tiene dos fragmentos Fab unidos por un enlace disulfuro en la región bisagra; fragmento Fv; un fragmento Fv monocatenario (scFv), véase, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) Science 242: 423-426; y Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; un fragmento Fd que tiene los dos dominios V_H y C_{H1}; dAb (Ward *et al.*, (1989) Nature 341:544-546), y otros fragmentos de anticuerpo que conservan la función de unión a antígeno. El fragmento Fab tiene dominios V_H-C_{H1} y V_L-C_L unidos covalentemente por un enlace disulfuro entre las regiones constantes. El fragmento Fv es más pequeño y tiene dominios V_H y V_L unidos de forma no covalente. Para superar la tendencia de dominios unidos de forma no covalente a disociarse, puede construirse un scFv. El scFv contiene un polipéptido flexible que une (1) el extremo C terminal de V_H con el extremo N terminal de V_L, o (2) el extremo C terminal de V_L con el extremo N terminal de V_H. Puede usarse un péptido de 15 unidades (Gly₄Ser)₃ como un enlazador, pero se conocen otros enlazadores en la técnica. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia y los fragmentos se evalúan con respecto a función de la misma manera que los anticuerpos intactos.

La expresión “**cantidad eficaz**” se refiere a una dosificación o cantidad que es suficiente para reducir la actividad de ERG o una proteína de fusión que comprende todo o una parte de un polipéptido de ERG humano, tal como una proteína ERG codificada por un transcrito de fusión *TMPRSS2/ERG*, para dar como resultado el alivio de los síntomas en un paciente o para conseguir un resultado biológico deseado. Por ejemplo, con el cáncer de próstata el resultado biológico deseado puede incluir una reducción del tamaño tumoral, una reducción de la puntuación de Gleason y/o diferenciación de tumor aumentada.

La expresión “**proteína ERG codificada por un transcrito de fusión *TMPRSS2/ERG***” se refiere a una proteína ERG truncada, tal como ERG3, codificada por un transcrito generado por un acontecimiento de fusión entre un promotor del gen *TMPRSS2* y un transcrito de *ERG* humano.

La expresión “**proteína de fusión**” se refiere a una proteína traducida a partir de un transcrito generado de un acontecimiento de fusión entre dos secuencias de nucleótidos. Una de las secuencias de nucleótidos puede ser una secuencia no codificante (por ejemplo, una secuencia de *TMPRSS2*, *SLC45A3* o *NDRG1*) mientras que la otra secuencia de nucleótidos representa toda o parte de una secuencia codificante (por ejemplo, ERG). Como alternativa, las dos secuencias de nucleótidos pueden ser ambas secuencias codificantes.

La expresión “**anticuerpo humano**” incluye anticuerpos que tienen regiones variables y constantes correspondientes sustancialmente a secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, las descritas por Kabat *et al.* (Véase Kabat, *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication N.º 91-3242). Los anticuerpos humanos pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDR y, en particular, CDR3. El anticuerpo humano puede tener al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o más posiciones reemplazadas con un resto de aminoácido que no está codificado por la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana.

Los términos “**tratamiento**” o “**tratar**” y similares se refieren a cualquier tratamiento de cualquier enfermedad o

afección en un mamífero, por ejemplo, particularmente un ser humano o un ratón, e incluye inhibir una enfermedad, afección o síntoma de una enfermedad o afección, por ejemplo, detener su desarrollo y/o retardar su aparición o manifestación en el paciente o aliviar una enfermedad, afección o síntoma de una enfermedad o afección, por ejemplo, provocando regresión de la afección o enfermedad y/o sus síntomas.

Los términos “**sujeto**”, “**hospedador**”, “**paciente**” e “**individuo**” se usan de forma intercambiable en el presente documento para hacer referencia a cualquier sujeto mamífero para el que se desee diagnóstico o terapia, particularmente seres humanos.

La expresión “**vehículo farmacéuticamente aceptable**” o “**excipiente farmacéuticamente aceptable**” significa disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y agentes antifúngicos, agentes isotónicos y agentes retardantes de la absorción, y similares, que son compatibles con la administración farmacéutica. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica.

El término “**aislado**”, cuando se usa en el contexto de un anticuerpo, se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente libre de su ambiente natural. Por ejemplo, una proteína aislada está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas de la fuente celular o tisular de la que derivó. El término también se refiere a preparaciones en las que la proteína aislada es suficientemente pura para composiciones farmacéuticas; o al menos 70-80 % (p/p) pura; o al menos 80-90 % (p/p) pura; o al menos 90-95 % (p/p) pura; o al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % (p/p) pura.

La expresión “**anticuerpo 9FY**” es un anticuerpo monoclonal producido por el clon de hibridoma llamado 9FY que se ha mantenido durante pases de cultivo celular sucesivos en el laboratorio en el Centro para la Investigación de Enfermedad Prostática en Rockville, Maryland desde el 17 de septiembre de 2008. También se han marcado, congelado y almacenado alícuotas del clon de hibridoma 9FY en el Centro para la Investigación de Enfermedad Prostática.

La expresión “**epítipo ERG 42-66**” se refiere a un epítipo conformacional o lineal formado por los restos de aminoácidos 42-66 de SEQ ID NO: 1.

La expresión “**polipéptido ERG 42-66**” se refiere a un polipéptido que tiene no más de 60 restos de aminoácidos, en el que el polipéptido incluye los restos de aminoácidos 42-66 de SEQ ID NO: 1. En ciertas realizaciones, el polipéptido ERG 42-66 tiene no más de 50, 40, 30 o 25 restos de aminoácidos.

La expresión “**ERG3 humano**” se refiere a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de REFERENCIA NP_891548; VERSIÓN NP_891548.1 GI:33667107:

```

1 mastikeals vvsedqslfe caygtphlak temtassssd ygqtskmspr vpqqdwlsqp
61 parvtikmec npsqvngsrn spdecsvakg gkmvgspdtv gmnygsymee khmpppnmtt
121 nerrvivpad ptlwstdhvr qwlewavkey glpdvnillf qnidgkelck mtkddfqrllt
181 psynadills hlhylretpl phltsddvdk alqnsprlmh arntggaafi fpntsvypea
241 tgritttrpdl pyeprrrsaw tghghptpqs kaaqpspstv pktedqrpql dpyqilgpts
301 srlanpgsgq iqlwqflllel lsdssnssci twegtngfek mtdpdevarr wgerkskpmn
361 nydklsralr yyydknimtk vhgkryaykf dfhgiaqalq phppesslyk ypsdlpymgs
421 yhahpqkmnf vaphppalpv tsssfpaapn pywnsptggi ypntrlptsh mpshlgtyy

```

(SEQ ID NO: 1)

2. Anticuerpos anti-ERG

Como se ha analizado anteriormente, *ERG* es un proto-oncogén que pertenece a la familia ETS de factores de transcripción. Debido al alto grado de homología entre miembros de la familia ETS de proteínas, la inducción de un anticuerpo contra un miembro específico de la familia sigue siendo un reto. Además, hasta la fecha, los anticuerpos policlonales inducidos contra ERG conservan unión no específica significativa, lo que evita que dichos anticuerpos se usen en una situación clínica (por ejemplo, IHC) para ayudar en la detección de células cancerosas o tejido que expresa ERG o proteínas de fusión que comprenden todo o parte de un polipéptido de ERG, tal como un polipéptido de ERG codificado por un transcrito de fusión *TPRSS2/ERG*, *SLC45A3/ERG* o *NDRG1/ERG* que se ha identificado en cánceres de próstata.

La presente divulgación proporciona anticuerpos para su uso en el tratamiento de un tumor maligno que se unen con ERG humano, en el que los anticuerpos se unen con el epítipo ERG 42-66. Los aminoácidos 42-66 de ERG3

humano están codificados por una secuencia de nucleótidos que se mapea en el exón 8 del locus de *ERG* (Owczarek *et al.*, 2004). El exón 8 se encuentra en *ERG2*, *ERG3*, *ERG4*, *ERG5* (exón parcial), *ERG7* y *ERG8* pero no en *ERG1* (Owczarek *et al.*, 2004). Por lo tanto, los anticuerpos desvelados en el presente documento no reaccionan de forma cruzada con la proteína ERG1.

Los anticuerpos, también conocidos como inmunoglobulinas, son normalmente proteínas glucosiladas tetraméricas compuestas de dos cadenas ligeras (L) de aproximadamente 25 kDa cada una y dos cadenas pesadas (H) de aproximadamente 50 kDa cada una. Pueden encontrarse dos tipos de cadena ligera, denominadas lambda y kappa, en anticuerpos. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de cadenas pesadas, pueden asignarse las inmunoglobulinas a cinco clases principales: A, D, E, G y M y pueden dividirse adicionalmente varias de estas en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Cada cadena ligera incluye un dominio variable (V) N terminal (VL) y un dominio constante (C) (CL). Cada cadena pesada incluye un dominio V N terminal (VH), tres o cuatros dominios C (CH) y una región bisagra. El dominio CH más próximo a VH se designa CH1. Los dominios VH y VL consisten en cuatro regiones de secuencias relativamente conservadas denominadas regiones marco conservadas (FR1, FR2, FR3 y FR4), que forman un armazón para tres regiones de secuencias hipervariables (regiones determinantes de complementariedad, CDR). Las CDR contienen la mayoría de los restos responsables de interacciones específicas del anticuerpo con el antígeno. Las CDR se denominan CDR1, CDR2 y CDR3. En consecuencia, los constituyentes de CDR en la cadena pesada se denominan H1, H2 y H3, mientras que los constituyentes de CDR en la cadena ligera se denominan L1, L2 y L3. La identificación y numeración de restos de marco conservado y CDR es como se describe por Chothia *et al.* Structural determinants in the sequences of immunoglobulin variable domain, J Mol Biol 1998, 278:457-79.

La CDR3 es normalmente la mayor fuente de diversidad molecular dentro del sitio de unión a anticuerpo. H3, por ejemplo, puede ser tan corto como de dos restos de aminoácidos o de más de 26 aminoácidos. Las estructuras subunitarias y configuraciones tridimensionales de clases diferentes de inmunoglobulinas se conocen bien en la técnica. Para una revisión de la estructura de anticuerpos, véase Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, eds. Harlow *et al.*, 1988. Un experto en la materia reconocerá que cada estructura subunitaria, por ejemplo, una estructura CH, VH, CL, VL, CDR, FR, comprende fragmentos activos, por ejemplo, la parte de la subunidad VH, VL o CDR que se une con el antígeno, es decir, el fragmento de unión a antígeno, o, por ejemplo, la parte de la subunidad CH que se une con y/o activa, por ejemplo, un receptor de Fc y/o complemento. Las CDR normalmente se refieren a las CDR de Kabat, como se describe en Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services (1991), eds. Kabat *et al.* Otro patrón para caracterizar el sitio de unión a antígeno es hacer referencia a los bucles hipervariables como se describen en Chothia. Véase, por ejemplo, Chothia, D. *et al.* (1992) J. Mol. Biol. 227: 799-817; y Tomlinson *et al.* (1995) EMBO J. 14: 4628-4638. Otro patrón es la definición de AbM usada por el software de modelación de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Véase, en general, por ejemplo, Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains en: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. y Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg). Las realizaciones descritas con respecto a CDR de Kabat pueden como alternativa implementarse usando relaciones descritas similares con respecto a bucles hipervariables de Chothia o a los bucles definidos de AbM.

En una realización, el anticuerpo para su uso en el tratamiento de un tumor maligno es un anticuerpo monoclonal que se une con el epítipo ERG 42-66 y se produce por el clon de hibridoma 9FY ("anticuerpo 9FY"). El dominio variable de cadena ligera del anticuerpo 9FY comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Las secuencias de aminoácidos de la CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo 9FY corresponden a SSVYY (SEQ ID NO: 4), YTS y LQFSTSPWT (SEQ ID NO: 5), respectivamente. El dominio variable de cadena pesada del anticuerpo 9FY comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. Las secuencias de aminoácidos de la CDR1, CDR2 y CDR3 del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo 9FY corresponden a GYTFTNYG (SEQ ID NO: 6), IDTYTGEP (SEQ ID NO: 7) y VRKRAYDYEIY (SEQ ID NO: 8), respectivamente.

En otra realización, el anticuerpo para su uso en el tratamiento de un tumor maligno es un anticuerpo monoclonal que se une con el epítipo ERG 42-66 e inhibe de forma competitiva la unión del anticuerpo 9FY con ERG3 humano. En otra realización más, el anticuerpo para su uso en el tratamiento de un tumor maligno es un anticuerpo monoclonal que se une con el epítipo ERG 42-66 e inhibe de forma competitiva la unión de un anticuerpo, que tiene una cadena ligera variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y una cadena pesada variable que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, con ERG3 humano. Si un anticuerpo inhibe de forma competitiva la unión de un anticuerpo con una proteína, tal como ERG3 humano, puede evaluarse usando métodos rutinarios en la técnica, incluyendo, por ejemplo, los métodos descritos en los ejemplos de la presente solicitud.

También se contemplan anticuerpos para su uso en el tratamiento de un tumor maligno, en los que las secuencias de CDR o dominios variables de cadena pesada o ligera difieren solamente de forma insustancial de los del anticuerpo 9FY. Normalmente, un aminoácido se sustituye por un aminoácido relacionado que tiene carga, características hidrófobas o estereoquímicas similares. Dichas sustituciones estarían dentro de la experiencia habitual de un experto. A diferencia de las CDR, pueden realizarse cambios más sustanciales en las FR sin afectar de forma adversa a las propiedades de unión de un anticuerpo.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo monoclonal para su uso en el tratamiento de un tumor maligno se une con el epítipo ERG 42-66 y comprende una cadena pesada que es al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 % o al menos aproximadamente 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo 9FY, y una cadena ligera que es al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 % o al menos aproximadamente 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo 9FY. En otras realizaciones, un anticuerpo monoclonal para su uso en el tratamiento de un tumor maligno se une con el epítipo ERG 42-66 y tiene seis CDR (H1, H2, H3, L1, L2 y L3) que son al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 % o al menos aproximadamente 98 % idénticas a las seis CDR (H1, H2, H3, L1, L2 y L3) de las secuencias de cadena pesada y ligera del anticuerpo 9FY. En una realización, el anticuerpo monoclonal para su uso en el tratamiento de un tumor maligno se une con el epítipo ERG 42-66 y comprende un dominio variable de cadena ligera idéntico a SEQ ID NO: 2 excepto por 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta 6, hasta 7 y, en ciertos casos, hasta 10 sustituciones de aminoácidos en las secuencias de CDR. En otra realización, el anticuerpo monoclonal se une con el epítipo ERG 42-66 y comprende un dominio variable de cadena pesada idéntico a SEQ ID NO: 3 excepto por 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta 6, hasta 7 y, en ciertos casos, hasta 10 sustituciones de aminoácidos en las secuencias de CDR. Las posiciones de aminoácidos específicas que pueden sustituirse en una CDR, así como el aminoácido donante que puede sustituirse en esas posiciones pueden determinarse fácilmente por un experto en la materia usando métodos conocidos, tales como los desvelados en la Solicitud de Estados Unidos publicada 2006/0099204.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo monoclonal para su uso en el tratamiento de un tumor maligno es un anticuerpo humanizado que se une con el epítipo ERG 42-66 y comprende (a) un dominio variable de cadena ligera que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 2; (b) un dominio variable de cadena pesada que comprende las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 3; y (c) las regiones marco conservadas de las regiones variables de cadena ligera y pesada de un anticuerpo humano. El anticuerpo humanizado comprende además opcionalmente regiones constantes de cadena ligera y pesada de al menos un anticuerpo humano.

En otra realización, el anticuerpo monoclonal para su uso en el tratamiento de un tumor maligno es un anticuerpo quimérico que se une con el epítipo ERG 42-66 y comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. El anticuerpo quimérico comprende además opcionalmente regiones constantes de cadena ligera y pesada de al menos un anticuerpo humano. En otra realización, el anticuerpo monoclonal para su uso en el tratamiento de un tumor maligno es un anticuerpo humano que se une con el epítipo ERG 42-66.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo monoclonal para su uso en el tratamiento de un tumor maligno que se une con el epítipo ERG 42-66 tiene una constante de disociación (K_D) de aproximadamente 280 nM o menos. En otras realizaciones, el anticuerpo monoclonal para su uso en el tratamiento de un tumor maligno que se une con el epítipo ERG 42-66 detecta carcinoma que expresa ERG con una especificidad de más del 99 %. En otras realizaciones, el anticuerpo monoclonal para su uso en el tratamiento de un tumor maligno que se une con el epítipo ERG 42-66 no reacciona de forma cruzada con la proteína FLI1 humana. La reactividad cruzada puede medirse usando métodos rutinarios en la técnica, incluyendo, por ejemplo, una transferencia de Western.

Los anticuerpos para su uso en el tratamiento de un tumor maligno proporcionados en la presente divulgación que se unen con el epítipo ERG 42-66 están opcionalmente aislados.

También puede ser deseable modificar los anticuerpos de la presente invención para mejorar la función efectora, por ejemplo, para potenciar la citotoxicidad mediada por células dependientes de antígeno (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) del antagonista. Pueden realizarse una o más sustituciones de aminoácidos o la introducción de cisteína en la región Fc, mejorando de esta manera la capacidad de internalización y/o destrucción celular mediada por complemento aumentada y ADCC. Véase Caron *et al.*, J. Ex. Med. 176: 1191-1195 (1991) y Shopes, B.J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992). Puede prepararse una proteína de fusión de anticuerpos que tiene regiones Fc dobles con capacidades tanto de ADCC como de lisis de complemento potenciadas. Los receptores de Fc típicos que se unen con una región Fc de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo IgG) incluyen, pero sin limitación, receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII y FcRn, incluyendo variantes alélicas y formas de corte y empalme alternativo de estos receptores. Se revisan receptores de Fc en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9: 457-92, 1991; Capel *et al.*, Immunomethods 4:25-34,1994; y de Haas *et al.*, J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41, 1995.

3. Ácidos nucleicos, clonación y sistemas de expresión

La presente divulgación proporciona además ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos desvelados o partes de los mismos. Los ácidos nucleicos pueden comprender ADN o ARN y pueden ser completa o parcialmente sintéticos o recombinantes. La referencia a una secuencia de nucleótidos como se expone en el presente

documento abarca una molécula de ADN con la secuencia específica y abarca una molécula de ARN con la secuencia específica en la que U sustituye a T, a no ser que el contexto requiera otra cosa.

Los ácidos nucleicos desvelados en el presente documento codifican al menos una CDR (H1, H2, H3, L1, L2, y/o L3), un dominio V_L (SEQ ID NO: 2) y/o un dominio V_H (SEQ ID NO: 3) del anticuerpo 9FY.

La presente divulgación también proporciona construcciones en forma de plásmidos, vectores, fagémidos, casetes de transcripción o expresión que comprenden al menos un ácido nucleico que codifica un dominio V_H y/o un dominio V_L del anticuerpo 9FY. La divulgación proporciona además una célula hospedadora que comprende una o más construcciones como anteriormente.

También se desvelan métodos para preparar los polipéptidos codificados por estos ácidos nucleicos. El método comprende expresar el polipéptido codificado del ácido nucleico codificante. Puede conseguirse expresión cultivando en condiciones apropiadas células hospedadoras recombinantes que contienen el ácido nucleico. Después de la producción por expresión puede aislarse y/o purificarse un dominio V_H o V_L, o miembro de unión específico, usando cualquier técnica adecuada, y después usarse según sea apropiado.

Se conocen bien en la técnica sistemas para clonación y expresión de un polipéptido en diversas células hospedadoras diferentes. Para células adecuadas para producir anticuerpos, véase *Gene Expression Systems*, Academic Press, eds. Fernandez *et al.*, 1999. Puede usarse cualquier sistema de expresión de proteínas compatible con la invención para producir los anticuerpos desvelados. Los sistemas de expresión adecuados incluyen animales transgénicos descritos en *Gene Expression Systems*, Academic Press, eds. Fernandez *et al.*, 1999.

Puede elegirse o construirse vectores adecuados, de modo que contengan secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea apropiado.

Un aspecto adicional de la divulgación proporciona una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico como se desvela en el presente documento. Un aspecto adicional desvelado en el presente documento es un método que comprende introducir dicho ácido nucleico en una célula hospedadora. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir transfección con fosfato cálcico, DEAE-Dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción usando retrovirus u otro virus, por ejemplo, vaccinia o, para células de insecto, baculovirus. Para células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación de cloruro cálcico, electroporación y transfección usando bacteriófagos. La introducción del ácido nucleico en las células puede seguirse de provocar o permitir la expresión del ácido nucleico, por ejemplo, cultivando células hospedadoras en condiciones para la expresión del gen.

4. Métodos para preparar anticuerpos

Están disponibles numerosos métodos conocidos por los expertos en la materia para obtener anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos usando métodos de ADN recombinante. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos 4.816.567, documentos EP 0 171 496, EP 0 173 494, WO 86/01533, EP 0 184 187, WO 87/02671; y solicitud japonesa 85239543.

También pueden producirse anticuerpos monoclonales preparando líneas celulares inmortalizadas capaces de producir anticuerpos que tienen la especificidad deseada. Dichas líneas celulares inmortalizadas pueden producirse de diversas maneras. Convenientemente, se hiperinmuniza con el inmunógeno deseado un vertebrado pequeño, tal como un ratón. Después se sacrifica el vertebrado, habitualmente varios días después de la inmunización final, se retiran las células del bazo, y se immortalizan las células del bazo. La técnica más común es la fusión con un compañero de fusión de células de mieloma, como se ha descrito por primera vez en Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495-497. Otras técnicas incluyen transformación con VEB, transformación con ADN desnudo, por ejemplo, oncogenes, retrovirus, etc., o cualquier otro método que proporcione mantenimiento estable de la línea celular y producción de anticuerpos monoclonales. Se describen técnicas específicas para preparar anticuerpos monoclonales en *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y Lane, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.

Pueden explorarse líneas celulares inmortalizadas usando métodos convencionales, tales como ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y análisis de resonancia de plasmón superficial (BIACORE™), para identificar uno o más híbridos que producen un anticuerpo que se une específicamente con un antígeno específico. Puede usarse cualquier forma del antígeno específico como el inmunógeno, por ejemplo, antígeno recombinante, formas de origen natural, cualquier variante o fragmento del mismo, así como péptido antigénico del mismo.

Un método ejemplar para preparar anticuerpos incluye explorar bibliotecas de expresión de proteínas, por ejemplo, bibliotecas de presentación en fagos o ribosomas. La presentación en fagos se describe, por ejemplo, en Ladner *et al.*, Patente de Estados Unidos N.º 5.223.409; Smith (1985) *Science* 228: 1315-1317; Clackson *et al.* (1991) *Nature*, 352: 624-628; Marks *et al.* (1991) *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597; documentos WO 92/18619; WO 91/17271; WO

92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; y WO 90/02809.

Además del uso de bibliotecas de presentación, el antígeno específico puede usarse para inmunizar a un animal no humano, por ejemplo, un roedor, por ejemplo, un ratón, hámster o rata. El animal no humano puede incluir al menos una parte de un gen de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, es posible modificar por ingeniería genética cepas de ratón deficientes en producción de anticuerpos de ratón con fragmentos grandes de los loci de Ig humanos. Usando la tecnología de hibridoma, pueden producirse y seleccionarse anticuerpos monoclonales específicos de antígeno derivados de los genes con la especificidad deseada. Véase, por ejemplo, XENOMOUSE™, Green *et al.* (1994) Nature Genetics 7: 13-21, documentos US 2003-0070185, WO 96/34096, publicado el 31 de octubre de 1996, y WO 96/33735, presentado el 29 de abril de 1996.

Puede obtenerse un anticuerpo monoclonal del animal no humano y después modificarse. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos humanizados, desinmunizados y quiméricos usando técnicas de ADN recombinante conocidas en este campo. Se han descrito diversos enfoques para preparar anticuerpos quiméricos. Véase, por ejemplo, Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 6851, 1985; Takeda *et al.*, Nature 314: 452, 1985, Cabilly *et al.*, Patente de Estados Unidos N.º 4.816.567; Boss *et al.*, Patente de Estados Unidos N.º 4.816.397; Tanaguchi *et al.*, Publicación de Patente Europea EP171496; Publicación de Patente Europea 0173494, Patente de Reino Unido GB 2177096B. La inmunización de un anticuerpo implica trasplantar el sitio de combinación de un anticuerpo no humano a un anticuerpo humano. Esto puede realizarse insertando las CDR no humanas en un marco conservado humano y opcionalmente regiones constantes humanas o trasplantando los dominios variables no humanos completos pero ocultándolos con una superficie de tipo humano por reemplazo de ciertos restos expuestos. Se desvelan detalles sobre la creación de un anticuerpo humanizado en la Patente de Estados Unidos N.º 5.472.693.

También pueden producirse anticuerpos humanizados, por ejemplo, usando ratones transgénicos que expresan genes de cadena pesada y ligera humanos, pero son incapaces de expresar los genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de ratón endógenos. Winter describe un método de injerto de CDR ejemplar que puede usarse para preparar los anticuerpos humanizados descritos en el presente documento (Patente de Estados Unidos N.º 5.225.439). Todos los CDR de un anticuerpo humano particular pueden reemplazarse con al menos una parte de una CDR no humana, o solamente algunas de las CDR pueden reemplazarse con CDR no humanas. Solamente es necesario reemplazar el número de CDR requeridas para la unión del anticuerpo humanizado con un antígeno predeterminado.

Pueden generarse anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos reemplazando secuencias del dominio variable Fv que no están directamente implicadas en la unión de antígeno con secuencias equivalentes de dominios variables Fv humanos. Se proporcionan métodos ejemplares para generar anticuerpos humanizados o fragmentos de los mismos por Morrison (1985) Science 229:1202-1207; por Oi *et al.* (1986) BioTechniques 4: 214; y por los documentos US 5.585.089; US 5.693.761; US 5.693.762; US 5.859.205; y US 6.407.213.

Esos métodos incluyen aislar, manipular y expresar las secuencias de ácido nucleico que codifican todos o una parte de los dominios variables Fv de inmunoglobulina de al menos uno de una cadena pesada o ligera. Dichos ácidos nucleicos pueden obtenerse de un hibridoma que produce un anticuerpo contra una diana predeterminada, como se ha descrito anteriormente, así como de otras fuentes. El ADN recombinante que codifica la molécula de anticuerpo humanizada puede después clonarse en un vector de expresión apropiado.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo humanizado para su uso en el tratamiento de un tumor maligno se optimiza por la introducción de sustituciones conservativas, sustituciones de secuencia consenso, sustituciones de línea germinal y/o retromutaciones. Dichas moléculas de inmunoglobulina alteradas pueden realizarse por cualquiera de varias técnicas conocidas en este campo (por ejemplo, Teng *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80: 7308-7312, 1983; Kozbor *et al.*, Immunology Today, 4: 7279, 1983; Olsson *et al.*, Meth. Enzymol., 92: 3-16, 1982) y pueden prepararse de acuerdo con las enseñanzas de la Publicación de PCT WO92/06193 o EP 0239400. Normalmente, se realizan sustituciones conservativas. Con frecuencia, pero no de forma exclusiva, puede usarse un aminoácido habitual en una posición en secuencias de anticuerpos de línea germinal humana. Se desvelan secuencias de línea germinal humana, por ejemplo, en Tomlinson, *et al.* (1992) J. Mol. Biol. 227: 776-798; Cook, G. P. *et al.* (1995) Immunol. Today Vol. 16 (5): 237-242; Chothia, D. *et al.* (1992) J. Mol. Biol. 227: 799-817; y Tomlinson *et al.* (1995) EMBO J. 14:4628-4638. El directorio V BASE proporciona un directorio exhaustivo de secuencias de región variable de inmunoglobulina humana (compiladas por Tomlinson, I.A. *et al.* MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, Reino Unido). Estas secuencias pueden usarse como una fuente de secuencia humana, por ejemplo, para regiones marco conservadas y CDR. También pueden usarse regiones marco conservadas humanas consenso, por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N.º 6.300.064.

Pueden generarse anticuerpos humanos usando métodos conocidos en la técnica, tales como tecnología de presentación en fagos. La tecnología de presentación en fagos imita el sistema inmunitario de mamíferos clonando bibliotecas grandes de clonación de genes de anticuerpos y seleccionando con respecto a unión con una diana deseada, tal como el epítipo ERG 42-66. Las bibliotecas usadas en tecnología de presentación en fagos pueden realizarse de varias fuentes. Por ejemplo, una biblioteca inmunitaria, creada a partir de seres humanos expuestos a un antígeno deseado a través de vacunación o enfermedad, tiene altos niveles de anticuerpos en circulación para el

antígeno incluso cuando la biblioteca es relativamente pequeña. Como otro ejemplo, una biblioteca sin exposición previa, realizada a partir de ARNm aislado de individuos no inmunizados, puede usarse repetidas veces para aislar anticuerpos contra diversos antígenos. Como otro ejemplo más, una biblioteca sintética, en la que se clonan segmentos génicos de anticuerpo de línea germinal y se disponen de forma combinatoria *in vitro* para reconstituir genes que codifican cadenas V_H y V_L completas, tiene la ventaja de producir anticuerpos con especificidad para autoantígenos. También pueden realizarse bibliotecas semisintéticas seleccionando una o más secuencias aleatorias y de marcos conservados de anticuerpos dentro de los bucles de CDR.

En la tecnología de presentación en fagos, una vez que se crea una biblioteca, esta se fusiona con una proteína de superficie de fagos, habitualmente pIII. En un proceso conocido como selección, los fagos que presentan un anticuerpo específico para el antígeno de interés se enriquecen por adsorción selectiva en antígeno inmovilizado. Posteriormente, el fago unido puede eluirse de la superficie y amplificarse mediante infección de células *E. coli*.

También se conocen en la técnica otras modificaciones de tecnología de presentación en fagos para generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, los anticuerpos pueden presentarse en las superficies de células microbianas tales como *E. coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, en lugar de en la superficie de bacteriófagos. En este caso, puede realizarse exploración por incubación con un ligando marcado con fluorescencia en tampón. Las células que presentan los anticuerpos que se unen con el ligando se marcan de forma fluorescente y se aíslan por separación de células activadas por fluorescencia. Otra modificación, denominada presentación de ribosomas, se basa en la formación de un complejo ternario entre ribosomas, ARNm y el polipéptido.

Otro método conocido en la técnica para producir anticuerpos humanos es uno que usa ratones transgénicos. El repertorio de inmunoglobulina nativa en estos ratones se ha reemplazado con genes V humanos en el cromosoma murino. Puede inyectarse a los ratones un antígeno deseado y los anticuerpos resultantes pueden recuperarse por clonación y exploración de una biblioteca inmunitaria o por tecnología de hibridoma convencional. Estos ratones producen niveles significativos de anticuerpos completamente humanos que difieren solamente en sus patrones de glucosilación.

Los anticuerpos anti-ERG descritos en el presente documento pueden derivatizarse o unirse con otra molécula funcional (tal como otro péptido o proteína (por ejemplo, como un fragmento Fab)). Por ejemplo, el anticuerpo puede unirse funcionalmente (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) con al menos otra entidad molecular, tal como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o uno multiespecífico), toxina, radioisótopo, agente citotóxico o citostático, entre otros.

5. Métodos de uso

Los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento que se unen con el epítipo ERG 42-66 pueden usarse en diversas aplicaciones de investigación y médicas. En un aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar un tumor maligno o enfermedad en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo monoclonal descrito en el presente documento que se une con el epítipo ERG 42-66 formulado en un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el tumor maligno o enfermedad está provocado por un acontecimiento de fusión de *ERG* (por ejemplo, fusión entre una secuencia promotora del gen *TPMRSS2*, *SLC45A3* o *NDRG1* y una secuencia del gen *ERG* o entre una primera secuencia génica y una secuencia del gen *ERG*) y/o sobreexpresión de *ERG*. El tumor maligno o enfermedad puede ser cáncer de próstata, sarcoma de Ewing, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica T aguda, leucemia megacarioblástica, cáncer de colon o una enfermedad de las células endoteliales, tal como cáncer endotelial. Asimismo, la enfermedad puede ser enfermedad de Alzheimer o síndrome de Down.

Además, los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento que se unen con el epítipo ERG 42-66 pueden usarse para detectar proteínas ERG, incluyendo proteínas de fusión que comprenden todo o una parte de un polipéptido de ERG, tal como una proteína ERG codificada por un transcrito de fusión *TPMRSS2/ERG*, *SLC45A3/ERG* o *NDRG1/ERG*, en una muestra biológica. El método comprende poner en contacto el anticuerpo monoclonal descrito en el presente documento que se une con el epítipo ERG 42-66 con la muestra biológica y analizar la muestra biológica para detectar la unión del anticuerpo monoclonal con ERG humano o la proteína de fusión en la muestra biológica. El polipéptido de ERG es ERG3. Asimismo, la proteína ERG codificada por el transcrito de fusión *TPMRSS2/ERG* o *SLC45A3/ERG* puede ser una proteína ERG3 truncada. La muestra biológica puede comprender un tejido o una célula, tal como un tejido de próstata o una célula de próstata. Asimismo, la muestra biológica puede comprender un fluido biológico, tal como orina o sangre, en el que el fluido biológico contiene células cancerosas tales como células de cáncer de próstata. Asimismo, el fluido biológico puede ser sangre, suero, orina, saliva, esputo o heces.

En otra realización, la divulgación proporciona un método para detectar cáncer o una enfermedad en un paciente, comprendiendo el método poner en contacto un anticuerpo monoclonal descrito en el presente documento que se une con el epítipo ERG 42-66 con una muestra biológica obtenida del paciente y analizar la muestra biológica, en el que la unión del anticuerpo con células en la muestra biológica indica la presencia de cáncer en la muestra biológica. El cáncer puede ser cáncer de próstata. Asimismo, el cáncer es sarcoma de Ewing, leucemia mieloide aguda,

leucemia linfoblástica T aguda, leucemia megacarioblástica, cáncer de colon o cáncer endotelial. La muestra biológica puede comprender un tejido o una célula, tal como un tejido de próstata o una célula de próstata. Asimismo, la muestra biológica puede comprender un fluido biológico, tal como orina o sangre, en el que el fluido biológico contiene células cancerosas, tales como células cancerosas de próstata. El fluido biológico puede ser sangre, suero, orina, saliva, esputo o heces. El cáncer o enfermedad puede asociarse con un acontecimiento de fusión de *ERG* (por ejemplo, fusión entre una secuencia promotora del gen *TMPRSS2*, *SLC45A3* o *NDRG1* y una secuencia del gen *ERG*) y/o sobreexpresión de *ERG*. La unión del anticuerpo con células hematopoyéticas o células endoteliales en vasos sanguíneos o capilares es normal y normalmente no indica la presencia de cáncer. Sin embargo, la detección de una proteína *ERG*, incluyendo proteínas de fusión que comprenden todo o una parte de un polipéptido de *ERG*, en cualquier célula distinta de una célula hematopoyética normal o una célula endotelial normal en vasos sanguíneos o capilares indica la presencia de cáncer en la muestra.

Además, como se muestra en los ejemplos, los anticuerpos anti-*ERG* descritos en el presente documento pueden usarse para detectar PIN positiva para *ERG*. Los pacientes que muestran neoplasia intraepitelial prostática (PIN) positiva para *ERG* probablemente también tengan cáncer de próstata positivo para *ERG* o tengan alto riesgo de desarrollar cáncer de próstata positivo para *ERG*. Por lo tanto, si se detecta PIN positiva para *ERG*, pero no cáncer de próstata positivo para *ERG*, en un paciente, el paciente debería someterse a biopsias adicionales o biopsias más frecuentes para controlar el desarrollo del cáncer de próstata en el paciente. En consecuencia, los anticuerpos anti-*ERG* descritos en el presente documento pueden usarse para fundamentar las decisiones acerca de si realizar biopsias adicionales o la frecuencia de biopsias futuras.

Los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento que se unen con el epítipo *ERG* 42-66 pueden usarse para controlar la eficacia de regímenes terapéuticos. Por lo tanto, se describe además un método para controlar la terapia de ablación hormonal, comprendiendo el método poner en contacto un anticuerpo monoclonal descrito en el presente documento que se une con el epítipo *ERG* 42-66 con una muestra biológica obtenida de un paciente que ha recibido terapia de ablación hormonal y medir la expresión de *ERG* humano o una proteína de fusión que comprende todo o una parte de un polipéptido de *ERG* humano en la muestra biológica, en el que la expresión de *ERG* reducida después de la terapia de ablación de andrógenos indica que la terapia de ablación hormonal fue eficaz y se correlaciona con un tiempo de supervivencia aumentado. El nivel de expresión de *ERG* en el paciente después de la terapia de ablación hormonal puede compararse con el nivel de expresión de *ERG* en el mismo paciente antes de comenzar la terapia de ablación hormonal o puede compararse con un valor de control normalizado, que representa un nivel aumentado de expresión de *ERG*.

También se describe un método para identificar una secuencia de ácido nucleico, tal como una secuencia promotora o un polipéptido que interacciona con un polipéptido de *ERG*. Los ácidos nucleicos y/o proteínas identificados por dichos métodos pueden definir nuevas dianas terapéuticas en la red de *ERG*. El método puede comprender incubar una muestra que comprende una molécula de ácido nucleico o un polipéptido con un polipéptido de *ERG*, incubar la muestra y el polipéptido de *ERG* con un anticuerpo que se une con el epítipo 42-66 *ERG* y determinar si se forma un complejo entre la molécula de ácido nucleico y el polipéptido de *ERG* o entre el polipéptido y el polipéptido de *ERG*, en el que la detección de la formación de un complejo con el anticuerpo indica que la molécula de ácido nucleico o polipéptido interacciona con el polipéptido de *ERG*. Dichos métodos pueden llevarse a cabo usando técnicas que son convencionales en este campo, incluyendo, por ejemplo, ensayos de inmunoprecipitación.

Puede usarse cualquier marcador apropiado en los métodos y composiciones descritos en el presente documento. Un marcador es cualquier molécula o composición unida con un analito, análogo de analito, reactivo detector o compañero de unión (por ejemplo, anticuerpo) que es detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Se han desvelado ejemplos de marcadores, incluyendo enzimas, partículas de oro coloidales, partículas de látex coloreadas (Patentes de Estados Unidos N.º 4.275.149; 4.313.734; 4.373.932; y 4.954.452). Los ejemplos adicionales de marcadores útiles incluyen, sin limitación, haptenos (por ejemplo, biotina, digoxigenina (DIG), dinitrofenol (DNP), etc.), isótopos radiactivos, co-factores, ligandos, agentes quimioluminiscentes o fluorescentes, partículas de plata adsorbidas en proteínas, partículas de hierro adsorbidas en proteínas, partículas de cobre adsorbidas en proteínas, partículas de selenio adsorbidas en proteínas, partículas de azufre adsorbidas en proteínas, partículas de telurio adsorbidas en proteínas, partículas de carbono adsorbidas en proteínas y bolsillos de colorantes acoplados a proteínas. La unión de un compuesto con un marcador puede ser mediante cualquier medio, incluyendo enlaces covalentes, procesos de adsorción, enlaces hidrófobos y/o electrostáticos, como en quelantes y similares, o combinaciones de estos enlaces e interacciones y/o pueden implicar un grupo enlazador.

Algunos marcadores, tales como haptenos, normalmente se acoplan con reactivos de detección para detección colorimétrica. Por ejemplo, la biotina puede acoplarse con un compuesto de estreptavidina-HRP que se detecta de forma colorimétrica usando DAB. Los expertos en la materia apreciarán la multitud de opciones de marcadores y detección que encuentran su utilidad como reactivos de detección útiles en composiciones y métodos.

Se puede detectar una molécula, tal como un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo monoclonal), directamente por conjugación con un resto detectable. Por ejemplo, pueden conjugarse directamente anticuerpos monoclonales como se describen en el presente documento con un resto detectable, tal como un compuesto fluorescente (incluyendo

fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftanelosulfonilo, ficoeritrina, fósforos lantánidos, colorantes ALEXA FLUOR® (Invitrogen, Carlsbad, CA) o la familia de colorantes de cianina (tales como Cy-3 o Cy-5) y similares); un compuesto bioluminiscente (tal como luciferasa, proteína verde fluorescente (GFP), proteína amarilla fluorescente, etc.); una enzima que produce un producto de reacción detectable (tal como peroxidasa de rábano rusticano, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina o glucosa oxidasa y similares) o un radiomarcador (tal como ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I o ^{131}I).

Puede detectarse indirectamente una molécula, tal como un anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo monoclonal). Por ejemplo, se inducen anticuerpos secundarios contra anticuerpos primarios (por ejemplo, un anticuerpo de ERG monoclonal como se describe en el presente documento) como se conoce por un experto en la materia, cuando el anticuerpo secundario se marca para detección. El anticuerpo secundario se conjuga con un resto detectable. Por ejemplo, el anticuerpo secundario puede conjugarse con una enzima indicadora tal como fosfatasa alcalina (AP) o peroxidasa de rábano rusticano (HRP) para detección colorimétrica posterior. El anticuerpo secundario puede conjugarse con un resto fluorescente como se ha descrito previamente (por ejemplo, FITC, colorantes Cy, colorantes ALEXA FLUOR® (Invitrogen, Carlsbad, CA), rodamina, etc.). Asimismo, se puede detectar indirectamente un anticuerpo de ERG monoclonal primario con un anticuerpo secundario conjugado con un hapteno, tal como biotina DNP, DIG, etc., que se acopla además con una molécula de reactivo detectable tal como estreptavidina-HRP, que se detecta posteriormente de forma colorimétrica por reacción con 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Un experto en la materia apreciará la multitud de métodos de detección enzimáticos y luminiscentes utilizados para la visualización de interacciones proteína-proteína como se describe en el presente documento.

6. Formulaciones y administración

La divulgación proporciona composiciones que comprenden un anticuerpo monoclonal descrito en el presente documento que se une con el epítipo ERG 42-66. Las composiciones pueden ser adecuadas para su uso farmacéutico y administración a pacientes. Estas composiciones comprenden un anticuerpo monoclonal descrito en el presente documento que se une con el epítipo ERG 42-66 y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones también pueden contener otros compuestos activos que proporcionan funciones terapéuticas complementarias, adicionales o potenciadas. Las composiciones farmacéuticas también pueden incluirse en un recipiente, envase o dosificador junto con instrucciones para su administración. La composición puede comprender un anticuerpo monoclonal descrito en el presente documento que se une con el epítipo ERG 42-66 para el tratamiento de una enfermedad, tal como enfermedad de Alzheimer, o un tumor maligno, tal como cáncer de próstata, sarcoma de Ewing, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica T aguda, leucemia megacarioblástica, cáncer de colon o cáncer endotelial.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para ser compatible con su vía pretendida de administración. Los expertos habituales en la materia conocen métodos para conseguir la administración. Estos incluyen, por ejemplo, inyecciones, por vías parenterales tales como intravenosa, intravascular, intraarterial, subcutánea, intramuscular, intratumoral, intraperitoneal, intraventricular, intraepidural u otras así como oral, nasal, oftálmica, rectal o tópica. También se contempla específicamente la administración de liberación prolongada, por medios tales como inyecciones de depósito o implantes erosionables. Se contempla particularmente el suministro localizado, por medios tales como suministro mediante un catéter a una o más arterias, tales como la arteria renal o un vaso que abastece a un tumor localizado.

En una realización se administra un anticuerpo objeto a un paciente por inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea. Puede administrarse un anticuerpo dentro de un intervalo de dosis entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 100 mg/kg; entre aproximadamente 1 mg/kg y 75 mg/kg; o de aproximadamente 10 mg/kg a 50 mg/kg. El anticuerpo puede administrarse, por ejemplo, por inyección de embolada o por infusión lenta. Puede usarse infusión lenta durante un periodo de 30 minutos a 2 horas.

Puede determinarse la toxicidad y eficacia terapéutica de la composición por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, determinando la DL_{50} (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación de $\text{DL}_{50}/\text{DE}_{50}$. Los anticuerpos que muestran índices terapéuticos grandes pueden ser menos tóxicos y/o terapéuticamente más eficaces.

7. Kits

Se pueden proporcionar moléculas relacionadas con ERG como se describen en el presente documento (por ejemplo, anticuerpo monoclonal, polipéptido, etc.) en forma de un kit útil, por ejemplo, para realizar los métodos descritos en el presente documento. Se puede proporcionar una cantidad apropiada de al menos una molécula relacionada con ERG (por ejemplo, anticuerpo monoclonal, polipéptido, etc.) en uno o más recipientes. Se puede proporcionar al menos una molécula relacionada con ERG (por ejemplo, anticuerpo monoclonal, polipéptido, etc.) suspendida en una solución acuosa o como un polvo liofilizado o criodesecado, por ejemplo. El recipiente o los recipientes en los que se proporciona la al menos una molécula relacionada con ERG (por ejemplo, anticuerpo

monoclonal, polipéptido, etc.) puede ser cualquier recipiente convencional que sea capaz de mantener la forma proporcionada, por ejemplo, tubos de microcentrífuga, ampollas o frascos. La cantidad de molécula relacionada con ERG (por ejemplo, anticuerpo monoclonal, polipéptido, etc.) proporcionada puede ser cualquier cantidad apropiada.

- 5 Pueden proporcionarse portaobjetos de control sobre los que se montan una o más preparaciones tisulares o celulares (por ejemplo, biopsia, xenoinjertos, sedimentos celulares o células coaguladas) que pueden actuar como controles positivos y/o negativos para una molécula relacionada con ERG (por ejemplo, anticuerpo monoclonal, polipéptido, etc.) en un recipiente apropiado y separado.
- 10 Otras realizaciones de kit incluyen medios para la detección de la molécula relacionada con ERG, tales como anticuerpos secundarios. En algunos de estos casos, el anticuerpo secundario se marca directamente con un resto detectable (como se ha descrito en otra parte en la presente divulgación). En otros casos, se conjuga el anticuerpo primario o secundario (o de mayor orden) con un hapteno (tal como biotina, DNP, DIG, etc.) que es detectable por una molécula de unión a hapteno afin marcada de forma detectable (por ejemplo, estreptavidina (SA)-peroxidasa de
- 15 rábano rusticano, SA-fosfatasa alcalina, SA-QDot® (Invitrogen, Carlsbad, CA), etc.). El anticuerpo primario o secundario se puede conjugar con un resto de detección fluorescente (por ejemplo, FITC, rodamina, colorantes ALEXA FLUOR® (Invitrogen, Carlsbad, CA), fluoróforos designados Cy, etc.). Algunos kits pueden incluir reactivos colorímetros (por ejemplo, DAB, AEC, etc.) en recipientes adecuados para usar en concierto con anticuerpos primarios o secundarios (o de mayor orden) que están marcados con enzimas para el desarrollo de dichos reactivos colorimétricos.
- 20

Un kit puede incluir materiales instructivos que desvelan métodos de uso de los contenidos del kit (por ejemplo, moléculas relacionadas con ERG) en un método desvelado. Los materiales instructivos pueden proporcionarse en cualquier variedad de formas, incluyendo, pero sin limitación, forma escrita (por ejemplo, papel impreso, etc.), en una

25 forma electrónica (por ejemplo, disquete informático o disco compacto) o puede ser visual (por ejemplo, archivos de video). Los kits también pueden incluir componentes adicionales para facilitar la aplicación particular para la que se ha diseñado el kit. Por lo tanto, por ejemplo, los kits pueden incluir adicionalmente tampones y otros reactivos usados habitualmente para la práctica de un método particular. Dichos kits y contenidos apropiados se conocen bien por los expertos en la materia.

30

A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto habitual en la técnica.

Ejemplos

35 Ejemplo 1. Generación de anticuerpo 9FY

Se obtuvo el clon de hibridoma 9FY inmunizando ratones Balb/C con un polipéptido sintetizado de forma química que tiene los aminoácidos 42-66 de SEQ ID NO: 1 y un resto de cisteína añadido en el extremo N o C terminal para

40 mantener el -COOH libre (no conjugado). El polipéptido de inmunización se conjugó con hemocianina de lapa californiana (KLH) y se inyectó en los ratones con un adyuvante en tres sitios de inyección separados a intervalos de tres semanas. La primera inyección usó el completo de Freund como el adyuvante. La segunda y tercera inyecciones usaron el adyuvante incompleto de Freund. Se evaluaron muestras sanguíneas de suero con respecto a unión con el polipéptido inmunizador usando una exploración de ELISA directa. Se eligieron los ratones con el mayor

45 título para la primera etapa de fusión de hibridoma. Se confirmaron ocho clones positivos por ELISA y se analizaron sobrenadantes por ensayos de inmunotransferencia usando proteína ERG3 expresada de forma heteróloga en células HEK-294. Se descubrió que dos de los clones eran positivos en el ensayo de inmunotransferencia. Se conservó uno de los clones negativos de la exploración secundaria como el control negativo. Los dos clones positivos y el control negativo se procesaron adicionalmente para clonación secundaria. Uno de los clones positivos

50 (9FY) que mostró inicialmente la actividad positiva más fuerte sobrevivió a la segunda etapa de clonación. El clon 9FY se cultivó y se inyectó en 10 ratones para producción de líquido ascítico. Se produjo líquido ascítico y se purificó el anticuerpo 9FY sobre una columna de Proteína G. Se determinó que el subtipo de anticuerpo 9FY era IgG de la fracción purificada.

55 Ejemplo 2. El anticuerpo 9FY reconoce específicamente la proteína ERG en células de cáncer de próstata

Las células VCaP (Korenchuck *et al.*, 2001, In Vivo, 15:163-68) son una línea celular de cáncer de próstata humana que sobreexpresa una fusión *TMPRSS2/ERG* frecuentemente detectada en tumores de próstata humanos. En

60 células VCaP, la transcripción del gen *ERG* endógeno está controlada por el promotor de *TMPRSS2* inducible por andrógenos. Las células LNCaP son una línea celular de cáncer de próstata humana que no alberga una fusión *TMPRSS2/ERG* y no expresa niveles detectables de ERG.

1. Transferencias de Western

65 Se cultivaron células LNCaP (ATCC N.º CRL-1740) y VCaP (ATCC, N.º CRL-2876) en medio RPMI-1640 (ATCC; N.º 30-2001) y DMEM (ATCC; N.º 30-2002), respectivamente, complementado con suero bovino fetal al 10 % (ATCC;

N.º 30-2020) y glutamina 2 mM. Se sembraron células LNCaP y VCaP (2×10^6) en placas de 10 cm y se mantuvieron durante cinco días y tres días, respectivamente, en medios con suero bovino fetal despojado por carbono al 10 % (c-FBS; N.º 100119 Gemini Bio-Products, Calabasas, CA). Para inducción de andrógenos, las células se cultivaron posteriormente en medio nuevo con c-FBS complementado con R1881 0,1 nM o R1881 1 nM durante otras 48 horas. Las células se recogieron y analizaron por transferencias de Western y microscopia.

En experimentos de transferencia de Western, el anticuerpo 9FY reconoce productos proteicos de longitud completa (aproximadamente 50-52 kDa) codificados por *TMPRSS2/ERG2* y *TMPRSS2/ERG3* en respuesta a inducción de andrógenos (R1881) (Fig. 1A). El anticuerpo 9FY no reconoció *ERG* en células LNCaP, que no albergan un transcrito de fusión *TMPRSS2/ERG*.

Para evaluar la especificidad del reconocimiento de anticuerpo 9FY, las células VCaP y células LNCaP inducidas por andrógeno sintético (R1881) se transfectaron con ARN inhibidor pequeño específico de *ERG* (ARNip de *ERG*) (Sun *et al.*, 2008) y/o un oligonucleótido de control, no dirigido ("NT"). El ARNip de *ERG* se dirige a una región de 19 pares de bases en el exón 11 y se predice que inhibe todas las variantes de corte y empalme de *ERG* conocidas en células prostáticas (Sun *et al.*, 2008). Se usó tubulina como un control de carga en el ensayo de inmunotransferencia.

Se prepararon lisados de células VCaP en reactivo de extracción de proteínas de mamífero M-PER® (Cat N.º 78501, Thermo, Rockford, IL,) complementado con cócteles de inhibidores de fosfatasa y proteasa (Cat N.º P2850 y P5726, Sigma, St. Louis, MO), de células VCaP transfectadas con oligonucleótidos de ARNip de *ERG* o NT (Dharmacon, Lafayette, CO) y se incubaron durante cuatro días. Las células se transfectaron con oligonucleótidos NT 50 nM, NT 25 nM y oligonucleótidos de ARNip de *ERG* 25 nM u oligonucleótidos de ARNip de *ERG* 50 nM (carril 3). Se cargaron 25 µg de lisados celulares en cada carril, se separaron en gel SDS NUPAGE® (Cat N.º NP0335, Invitrogen, Carlsbad, CA), se transfirieron a membranas de PVDF y se sometieron a transferencia de Western con anticuerpo 9FY 1:10.000. Se transfirieron geles idénticos a membranas de PVDF (Cat N.º LC2005, Invitrogen, Carlsbad, CA) y se exploraron con anticuerpo anti-SLC45A3 1:1.000 (Cat M361529-2), anticuerpo anti-PSA 1:3.000 (Cat N.º A056201-2, ambos de DAKO, Carpinteria, CA) y anti-alfa-tubulina 1:1000 (Cat N.º Sc-5286, Santa Cruz, CA).

Se prepararon lisados de células LNCaP a partir de células que se habían cultivado en RPMI1640 complementado con suero despojado por carbono al 10 % durante cinco días y se mantuvieron además en medio sin R1881 nuevo o se estimularon con R1881 0,1 nM o 1 nM durante 48 horas. De forma similar, se prepararon lisados de células VCaP a partir de células que se habían cultivado en DMEM complementado con suero despojado por carbono durante tres días y se mantuvieron además en medio sin R1881 nuevo o se estimularon con R1881 0,1 nM o 1 nM durante 48 horas. Se cargaron 25 µg de lisados celulares en cada carril, se separaron en gel SDS NUPAGE® (Invitrogen, Carlsbad, CA), se transfirieron a membranas de PVDF y se sometieron a transferencia de Western con anticuerpo 9FY 1:10.000. Se transfirieron geles idénticos a membranas de PVDF y se exploraron con anticuerpo anti-SLC45A3 1:1.000, anticuerpo anti-PSA 1:3.000 y anti-alfa-tubulina 1:1000 como se ha descrito anteriormente. Se lisaron células VCaP, COLO320, MOLT-4 y KG-1 en reactivo de extracción de proteína de mamífero M-PER®, y se determinó su concentración de proteínas. Se cargaron 25 µg de los lisados celulares en cada carril, se separaron en gel SDS NUPAGE® (Invitrogen, Carlsbad, CA), se transfirieron a membranas de PVDF y se sometieron a transferencia de Western con anticuerpo 9FY 1:10.000 como se ha descrito anteriormente.

De forma coherente con los resultados anteriores, se detectó la reducción significativa de los niveles de proteína *ERG* endógena con el anticuerpo 9FY (dilución 1:10.000) en respuesta al tratamiento con ARNip de *ERG* (Fig. 1B). Como un control adicional, los inventores examinaron también la respuesta de expresión de genes diana cadena abajo regulados negativamente de *ERG*, prosteína (*SLC45A3*) y antígeno específico de próstata, PSA (*KLK3*) (Sun *et al.*, 2008). Como se esperaba, fue evidente una regulación positiva notable de prosteína y PSA en células VCaP en respuesta a ARNip de *ERG* (Fig. 1A y Fig. 1B, paneles inferiores).

2. ELISA

En un ensayo de ELISA, los inventores evaluaron la sensibilidad y especificidad del anticuerpo 9FY midiendo el título de diversas concentraciones del polipéptido inmunizador (es decir, aminoácidos 42-66 de SEQ ID NO: 1). Para ELISA directo, las placas se recubrieron en primer lugar con 100 µl de antígeno de *ERG3* a 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml y 1 µg/ml y se incubaron durante 16 h a 4 °C en un agitador antes de lavar la placa cinco veces con PBSt (300 µl/pocillo). Se añadió anticuerpo 9FY de detección conjugado con biotina diluido en SuperBlock B a 74 pg/100 µl/pocillo y las placas se incubaron durante 1 h en un agitador (esta y todas las etapas posteriores se realizan a temperatura ambiente). La placa se lavó con PBSt (300 µl/pocillo). A continuación se añadió estreptavidina-peroxidasa de rábano rústico (HRP) en PBS (100 µl/pocillo) y se incubó durante 30 minutos en un agitador a temperatura ambiente. La placa se lavó después con PBSt (300 µl/pocillo) antes de añadir TMB a 100 µl/pocillo y se dejó que se desarrollara durante 5 min en un agitador antes de añadirse a la solución de Parada a 50 µl/pocillo. Se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de placas ELISA MULTISKAN® Ascent (Thermo Scientific, Waltham, MA) de acuerdo con la recomendación del fabricante y se representó la absorbancia frente a la dilución del anticuerpo. Para ELISA indirecto, las placas se recubrieron en primer lugar con 100 µl (570 pg)/pocillo del anticuerpo anti-*ERG*

de epítipo C y se incubaron durante 16 h a 4 °C. Se añadió SuperBlock (Cat. N.º PI-37515. Thermo Scientific, Rockford IL) a 300 µl/pocillo y se incubó durante 1 h (esta y todas las etapas posteriores se realizan a temperatura ambiente) en un agitador. Se añadieron 200 ng de antígeno ERG3 a (100 µl/pocillo) y se incubaron durante 2 horas en un agitador antes de lavarse la placa con PBSt (300 µl/pocillo). Se añadió anticuerpo 9FY de detección conjugado con biotina diluido en SuperBlock B a 74 pg/100 µl/pocillo y las placas se incubaron durante 1 h en un agitador. La placa se lavó con PBSt (300 µl/pocillo) y a continuación se añadió estreptavidina-HRP en PBS (100 µl/pocillo) y se incubó durante 0,5 h en un agitador (temperatura ambiente). La placa se lavó con PBSt (300 µl/pocillo) de nuevo. Se añadió después tetrametilbenzidina (TMB) a 100 µl/pocillo y se dejó que se desarrollara durante 5 min en un agitador antes de añadirse solución de Parada a 50 µl/pocillo. La absorbancia se midió a 450 nm en un lector de placas ELISA MULTISKAN® Ascent (Thermo Scientific, Waltham, MA) de acuerdo con la recomendación del fabricante y se representó la absorbancia frente a la dilución de anticuerpos.

El anticuerpo 9FY reconoció el polipéptido de inmunización correspondiente a los aminoácidos 42-66 de SEQ ID NO: 1. La titulación del anticuerpo y el ensayo de inhibición competitiva revelaron que el polipéptido inmunizador, pero no dos polipéptidos de control, compite por la unión con el anticuerpo 9FY frente a la proteína ERG3 (Fig. 2A) y que el anticuerpo 9FY purificado puede detectarse en el intervalo de dilución 5000-20000X (Fig. 2B).

3. Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina *in vivo*

Para evaluar adicionalmente la especificidad del anticuerpo 9FY, los inventores ensayaron el reclutamiento de *ERG* endógeno a elementos reguladores génicos definidos previamente por ensayo de inmunoprecipitación de cromatina *in vivo* (ChIP) (Sun *et al.*, 2008). La expresión de proteína ERG codificada por un transcrito de fusión *TMPRSS2/ERG* se indujo por R1881 en células VCaP y las células se transfectaron por ARNip de *ERG* para anular *ERG* o por ARNip no dirigido (NT) de control. Las células se procesaron por ensayo ChIP y la cromatina se inmunoprecipitó usando el anticuerpo 9FY. En ausencia de ARNip de *ERG*, se recluta la proteína ERG endógena a secuencias génicas diana. Por el contrario, se observó reducción robusta de la unión de la proteína ERG con las regiones reguladoras de los genes *HPGDH*, *C-MYC*, proteína (*SLC45A3*) y *PSA/CLK3* (Fig. 3) en respuesta a anulación de ERG. Este resultado es coherente con la inmunoprecipitación específica de la cromatina unida a ERG por el anticuerpo.

4. Inmunofluorescencia (IF)

El anticuerpo 9FY se evaluó adicionalmente en células VCaP por el método de IF (Figura 4). Las células VCaP se transfectaron con oligonucleótidos de ARNip NT o de *ERG*, los medios de cultivo se reemplazaron con DMEM nuevo complementado con suero despojado por carbono al 10 % y R1881 0,1 nM y se incubaron adicionalmente durante 48 horas. Para inmunotinción, las células se fijaron en primer lugar en formaldehído al 4 % nuevo en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se permeabilizaron en PBS-T (PBS + TritonX-100 0,1 %) antes de centrifugarse en portaobjetos de vidrio con una centrífuga CYTOSPIN® 4 (Thermo Scientific, Waltham, MA). Las células se bloquearon después en PBS-NT20 (PBS complementado con suero de caballo normal al 1 % (Cat N.º S-2000, Vector laboratories, Burlingame, CA) y Tween-20 0,1 %). Las células se incubaron después con anticuerpo primario contra SLC45A3 o PSA (ambos de DAKO, Carpinteria, CA), se diluyeron en PBS-NT20 a temperatura ambiente. Las células se lavaron con PBS-NT20 antes de que se aplicaran los anticuerpos secundarios ALEXA FLUOR® 594 de cabra anti-ratón (Invitrogen, Carlsbad, CA; Cat N.º A11302), ALEXA FLUOR® 488 de cabra anti-conejo (Invitrogen, Carlsbad, CA; Cat N.º A11304) y DAPI. Las células se lavaron y se montaron con FLUOROMOUNT G™ (SouthernBiotech, Birmingham, AL). Se capturaron imágenes usando un objetivo 40X/0,65 N-Plan en un microscopio invertido Leica DMIRE2 con una cámara CCD QImaging Retiga-EX (Burnaby, BC, Canadá), operada por software OpenLab (Improvision, Lexington, MA). Las imágenes se convirtieron a color y se mezclaron usando Photoshop (Adobe). Para competición de péptidos, se diluyeron el polipéptido inmunizador competitivo (aminoácidos 42-66 de SEQ ID NO: 1) y polipéptidos de ERG de control, no competitivos, a partir de una solución de reserva y se mezclaron con el anticuerpo en un exceso de 2000 veces en concentración molar sobre el anticuerpo en la concentración final. Las mezclas de anticuerpo-polipéptido se incubaron en hielo durante 30 min antes de aplicar a la muestra de ensayo tisular como se ha descrito.

El anticuerpo 9FY reconoció específicamente la proteína ERG como se muestra por tinción nuclear característica de la función de factor de transcripción de *ERG*. Las células VCaP se transfectaron con ARNip que anula eficazmente *ERG* como se ha mostrado previamente (Sun *et al.*, 2008). De hecho, se observó reducción robusta de los niveles de proteína ERG endógena en respuesta al tratamiento con ARNip de *ERG* en comparación con células tratadas con ARNip no dirigido de control. ERG es un represor de los genes marcadores de diferenciación de próstata (Sun *et al.*, 2008; Tomlins *et al.*, 2008). Por lo tanto, la elevación de los niveles de PSA es coherente con la anulación eficaz de *ERG* (Fig. 4A). Para establecer la especificidad de reconocimiento del anticuerpo 9FY, el anticuerpo compitió con un exceso 2000X del polipéptido inmunizador competitivo antes del ensayo de IF en células VCaP. Un exceso molar de 2000x veces del polipéptido inmunizador (péptido competidor) fue suficiente para eliminar la señal de IF de una manera específica de anticuerpo 9FY. Por el contrario, los polipéptidos de ERG de control (péptido no competidor) no consiguieron competir con el anticuerpo 9FY (Fig. 4B). La tinción de Antígeno Específico de Próstata (PSA) Citoplasmático no se ve afectada por el polipéptido inmunizador o el polipéptido de control. Se usó la expresión

citoplasmática inducible por hormonas de PSA como un control positivo para la activación andrógena de expresiones de los genes de ERG y PSA (Fig. 4C). En células LNCaP que no albergan fusiones *TMPRSS2/ERG* ni expresan niveles detectables de ERG endógeno, el anticuerpo 9FY no reconoció ERG. La expresión de proteína PSA en respuesta a R1881 es fácilmente detectable en células LNCaP y es coherente con la expresión inducible por andrógeno de PSA. Para definir el intervalo de concentraciones para la especificidad del anticuerpo 9FY los inventores descubrieron que el reconocimiento de ERG por el anticuerpo 9FY cumple los criterios incluso en el intervalo de concentraciones de 1:5.000 a 1:20.000 de dilución de reserva de 3,7 mg/ml (Fig. 4D). En ausencia de anticuerpo 9FY, el anticuerpo secundario no consigue detectar ningún epítipo en células VCaP. Este resultado excluyó la posibilidad de tinción no específica de proteínas de fondo en los experimentos de IF (Fig. 4E).

Ejemplo 3. Tinción inmunohistoquímica en muestras de ensayo FFPE

El anticuerpo 9FY también se ensayó en muestras de ensayo de próstata humana incluidas en parafina fijadas con formalina (FFPE). Se fijaron muestras de ensayo de prostatectomía radical en formalina y se incluyeron como montajes completos en parafina. Cada próstata se seccionó a intervalos de 0,22 cm en un plano transversal perpendicular al eje largo de la superficie posterior de la próstata y se incluyó completamente como montajes completos. Las secciones se analizaron con respecto a tinción de inmunohistoquímica (IHC) en secciones de cuatro micrómetros de los bloques de montaje completo.

Las secciones tisulares para IHC se prepararon como se ha descrito previamente (Furusato *et al.*, 2007). Los portaobjetos se incubaron con anticuerpo 9FY 1:1200. Se usó VECTOR® VIP (Vector Laboratories, Burlingame, CA) (púrpura) como sustrato cromógeno y los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina. La IHC reveló tinción nuclear de células tumorales prostáticas que es coherente con la localización subcelular del factor de transcripción de *ERG* (Figs. 5A-5D). Por el contrario, el anticuerpo 9FY no tiñe epitelios normales ni el estroma en la próstata humana. Las células endoteliales de la vasculatura mostraron tinción con anticuerpo 9FY que es coherente con la expresión constitutiva establecida de *ERG* de tipo silvestre en células endoteliales (Birdsey *et al.* 2008; McLaughlin *et al.*, 1999; Rainis *et al.*, 2005). Por lo tanto, la tinción de células endoteliales puede usarse por los patólogos como una referencia interna cuando se observa reactividad de IHC epitelial tumoral con el anticuerpo 9FY. La evaluación de muestras de ensayo de montaje completo de más de 150 pacientes de cáncer de próstata ha confirmado la especificidad del anticuerpo 9FY.

Ejemplo 4. Detección de proteína ERG en otras líneas celulares de cáncer

Habiendo establecido la especificidad del anticuerpo 9FY en la línea celular de cáncer de próstata VCaP, los inventores evaluaron adicionalmente ese anticuerpo con respecto a la detección de proteína ERG en líneas celulares que se ha descrito previamente que expresan altos niveles de ARN de *ERG*, incluyendo COLO 320 (cáncer de colon (Quinn *et al.*, 1979)), KG1 (leucemia mieloide aguda, (Koeffler y Golde, 1978)) y MOLT4 (leucemia linfoblástica T aguda humana (Minowada *et al.*, 1972)). Se cultivaron células Colo320 (ATCC N.º CCL-220.1) y MOLT-4 (ATCC N.º CRL-1582) en RPMI-1640 complementado con FBS 10 %. Se cultivaron células KG-1 en DMEM modificado por Iscove (Cat N.º 12440-053, Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con FBS 10 %. Las células se recogieron y se analizaron por transferencias de Western y microscopia como se ha descrito anteriormente. El ensayo de inmunotransferencia de COLO 320 (cáncer de colon (Quinn *et al.*, 1979)), KG1 (leucemia mieloide aguda, (Koeffler y Golde, 1978)) y MOLT4 (leucemia linfoblástica T aguda humana (Minowada *et al.*, 1972)) con el anticuerpo 9FY detectó una especie proteica predominante (Fig. 6), que indica la utilidad de este anticuerpo en la detección y evaluación de proteínas ERG en cánceres humanos distintos del cáncer de próstata.

Ejemplo 5. Especificidad del anticuerpo 9FY

1. Transferencias de Western

Usando transferencias de Western, se comparó la especificidad del anticuerpo 9FY con anticuerpos anti-ERG policlonales disponibles en el mercado (C-20 (sc-353) o H95 (sc-28680)) usando lisados celulares de células HEK293 transfectadas con un transcrito de fusión *TMPRSS2/ERG3*. El anticuerpo 9FY se usó a 1:5000; C20 (sc-353) (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA) y H95 (sc-28680) (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA) se usaron a diluciones 1:1000. El anticuerpo 9FY detecta la proteína ERG expresada de forma exógena codificada por el transcrito de fusión *TMPRSS2/ERG3* (52 kDa) como una única especie en transferencias de Western de células HEK293 transfectadas con *TMPRSS2/ERG3*, destacando la especificidad del anticuerpo 9FY (Fig. 7). Por otro lado, los anticuerpos policlonales anti-ERG disponibles en el mercado reaccionan con múltiples proteínas en transferencias idénticas. Específicamente, los anticuerpos C20 policlonales disponibles en el mercado (sc-353) y anticuerpos H95 policlonales (sc-28680) carecían de la especificidad del anticuerpo 9FY, como se demuestra por las múltiples bandas en las transferencias de Western obtenidas con esos anticuerpos policlonales (Fig. 7). De acuerdo con la bibliografía de producto disponible, C20 reconoce un epítipo que se mapea en el extremo C terminal de ERG1, ERG2 y ERG3 humano, mientras que H95 reconoce un epítipo que se mapea en los aminoácidos 26-120 de ERG2 y ERG3 humano (Owczarek *et al* 2004).

La especificidad de los anticuerpos H95 policlonales se analizó adicionalmente usando lisados celulares de células

LNCaP y VCaP. Se prepararon lisados a partir de células LNCaP y VCaP tratadas con o sin el andrógeno R1881 o transfectadas con oligonucleótidos de ARNip de ERG o No Dirigidos (NT), como se ha descrito anteriormente. Notablemente, los anticuerpos H95 detectaron múltiples bandas no específicas en lisados de células LNCaP y VCaP y detección cuestionable de la diana, un polipéptido de ERG truncado, de 52 kDa, codificado por un transcrito de fusión *TMPRSS2/ERG* (comparar Figs. 9A/B con Figs. 1A/B).

El anticuerpo 9FY también se ha usado para detectar una oncoproteína ERG codificada por el transcrito de fusión *TMPRSS2/ERG8*. Se cultivaron células HEK-293 en medio DMEM, complementado con suero bovino fetal al 10 % y glutamina 2 mM. Se sembraron células HEK-293 (2×10^6) en placas de 10 cm y se mantuvieron durante dos días, antes de la transfección con 4 µg de ADN plasmídico pIRES-EGFP(CMV), pIRES-EGFP(CMV)-*TMPRSS2-ERG3*, pIRES-EGFP(CMV)-*ERG3* o pIRES-EGFP(CMV)-*TMPRSS2-ERG8*. Se usó LIPOFECTAMINE™ 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA; Cat N.º 11668-027) para transfección, y 48 horas después se recogieron células y se analizaron los lisados celulares totales equivalentes a 4 o 20 µg de proteína por transferencia de Western usando el anticuerpo 9FY a dilución 1:5000. El anticuerpo 9FY reconoció bandas proteicas predominantes coherentes con los tamaños predichos de la proteína ERG3 de tipo silvestre (53 kDa), la oncoproteína codificada por *TMPRSS2/ERG3* (50-52 kDa) y la proteína codificada por *TMPRSS2/ERG8* (37 kDa) (Fig. 13).

El polipéptido inmunizador no mostró homología significativa con proteínas pertenecientes a la familia de proteínas ETS humana, excepto por un segmento de la proteína FLi1 humana (Kubo *et al.*, 2003) que tiene 48 % de identidad de secuencia con el péptido inmunizador. Por lo tanto, el anticuerpo 9FY se ensayó para ver si puede diferenciar entre ERG3 humano y la proteína FLi1 humana usando ensayos de transferencia de Western. En este ensayo, se evaluó ERG3 humano expresado de forma transitoria (codificado por la construcción *TMPRSS2/ERG3*) o proteína FLi1 humana con el anticuerpo 9FY. Para asegurar que estuviera presente una cantidad comparable de la proteína FLi1 humana en el ensayo se expresaron proteínas tanto ERG3 como FLi1 humana con marcadores FLAG C terminal y N terminal, respectivamente. El anticuerpo 9FY reconoció solamente proteína ERG3 y no mostró inmunorreactividad con la proteína FLi1 humana.

2. Tinción de inmunofluorescencia (IF)

La especificidad de los anticuerpos C20 y H95 se analizaron adicionalmente usando ensayos IF. Mientras que el anticuerpo 9FY mostró tinción nuclear de células de tumor de próstata (Fig. 4) en ensayos IF, los anticuerpos C20 policlonales (sc-353) reconocieron no solamente la proteína ERG nuclear sino también proteínas citoplasmáticas no específicas (Fig. 9A, columna 1) en células VCaP. La anulación de ERG con ARNip de *ERG* no eliminó completamente la tinción de ERG nuclear y citoplasmática no específica (Fig. 9A, columna 2) de los anticuerpos C-20. Los anticuerpos C20 (sc-353) reconocen ERG3 sobreexpresado en células LNCaP por infección con construcciones adenovíricas Ad-ERG3A (Fig. 9A, columna 6), pero la tinción aún se detectó después de la anulación con ARNip de *ERG* (Fig. 9A, columna 7). Se muestran experimentos de control negativos para ARNip e infección adenovírica en la Fig. 9A, columnas 3, 4 y 5.

Los anticuerpos C20 (sc-353) reconocen proteína ERG nuclear en células VCaP (Fig. 9B, columna 1, panel superior). Sin embargo, la anulación con ARNip de *ERG* no eliminó la tinción de ERG nuclear sino que dio como resultado aumento del fondo (Fig. 9B, columna 1, panel inferior). En las Figuras 9A y 9B, ERG se tiñe por anticuerpos C20 (sc-353) primarios seguido de anticuerpo secundario de cabra anti-conejo ALEXA FLUOR® 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA) (verde). En la Fig. 9A, las células se contratiñeron con faloidina marcada con ALEXA FLUOR® 594 (Invitrogen, Carlsbad, CA; Cat N.º A12381) para perfilar la estructura nuclear. En la Fig. 9B, el SLC45A3 inducible por andrógenos que está controlado negativamente por ERG se tiñe por anti-SLC45A3 monoclonal de ratón seguido de anticuerpo secundario de cabra anti-ratón ALEXA FLUOR® 594 (Invitrogen, Carlsbad, CA) (rojo). El ADN se tiñe por DAPI (azul).

Los anticuerpos H95 (sc-28680), como los anticuerpos C-20, tiñeron proteínas nucleares y proteínas citoplasmáticas no específicas (Fig. 10, columna 1) en células VCaP. Además, la anulación de ERG con ARNip de *ERG* no mostró ninguna diferencia significativa en la tinción (Fig. 10, columna 2) en células VCaP. Se detectó ERG3 sobreexpresado en células LNCaP por infección con construcciones adenovíricas de Ad-ERG3 por H95 (sc-28680) (Fig. 10, columna 6) pero la tinción no se vio afectada por la anulación con ARNip de *ERG* (Fig. 10, columna 7). Además, en un experimento de control negativo para ARNip e infección adenovírica ((Fig. 10, columnas 3, 4 y 5) en células LNCaP (que no albergan la fusión *TMPRSS2/ERG* o expresan niveles detectables de ERG endógeno), los anticuerpos H95 (sc-28680) muestran altos niveles de tinción de fondo no específica. En la Fig. 10, ERG está teñido por H95 primario (sc-28680) seguido de anticuerpo secundario de cabra anti-conejo ALEXA FLUOR® 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA) (verde). Las células se contratiñeron con faloidina marcada con ALEXA FLUOR® 594 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para perfilar la estructura nuclear. El ADN se tiñe por DAPI (azul).

También se analizó un tercer anticuerpo policlonal de ERG disponible en el mercado, R-20 (sc-18136) (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA), por IF. De acuerdo con la bibliografía de producto disponible para R-20, se recomienda para detectar ERG3 y se une con un epítipo que se mapea en un región interna de ERG3 humano. ERG-3 R20 (sc-18136) muestra tinción nuclear, así como tinción citoplasmática no específica (Fig. 11, columna 1).

La anulación de ERG con ARNip de *ERG* redujo la tinción nuclear pero no estuvo cerca de eliminar la tinción nuclear (Fig. 11, columna 2), como se observó con el anticuerpo 9FY (Fig. 4A). Se detectó ERG3 sobreexpresado en células LNCaP por infección con construcciones adenovíricas de Ad-ERG3 por R20 (sc-18136) (Fig. 11, columna 6) pero aún se detectó después de la anulación con ARNip de *ERG* (Fig. 11, columna 7). Los anticuerpos R20 (sc-18136) también muestran altos niveles de tinción de fondo en el experimento de control negativo para ARNip e infección adenovírica (Fig. 11, columnas 3, 4 y 5). En la Fig. 11, ERG está teñido por anticuerpos R20 (sc-18136) primarios seguido de anticuerpo secundario de burro anti-cabra ALEXA FLUOR® 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA) (verde). Las células se contratiñeron con faloidina marcada con ALEXA FLUOR® 594 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para perfilar la estructura nuclear. El ADN se tiñe por DAPI (azul).

Se realizó otro ensayo de IF para evaluar la capacidad de H95 y 9FY para inhibir de forma competitiva la unión del otro anticuerpo con ERG. Los resultados de este ensayo de IF competitivo confirman que el anticuerpo 9FY tiñe exclusivamente el núcleo de células VCaP con alta afinidad. Por el contrario, H-95 tiñe una proteína o proteínas desconocidas en el citoplasma y el núcleo de células VCaP. En competición cruzada paralela, un exceso 10X del anticuerpo 9FY (2 µg/ml) inhibe la tinción nuclear de H-95, sin embargo, la tinción citoplasmática no específica por H95 permanece (Fig. 12, columna 1). Por el contrario, el anticuerpo 9FY en (0,2 µg/ml) aún muestra tinción nuclear definida en presencia de un exceso de 10 veces de H-95 (2 µg/ml) (Fig. 12, columna 5). A igual concentración de anticuerpos (0,4 µg/ml) el anticuerpo 9FY muestra tinción nuclear más fuerte, altamente específica y definida en comparación con H95 (Fig. 12, columna 3).

De forma coherente con los otros estudios de anticuerpo analizados anteriormente, estos resultados muestran que el anticuerpo 9FY reconoce una única proteína en el núcleo de células VCaP. Por el contrario, los anticuerpos policlonales H-95 reaccionan con múltiples proteínas indefinidas tanto en el citoplasma como en el núcleo. Además, el anticuerpo 9FY muestra mayor afinidad en comparación con H95.

3. Tinción de inmunohistoquímica

Usando tinción de inmunohistoquímica, se compara la especificidad del anticuerpo 9FY con un anticuerpo anti-ERG policlonal disponible en el mercado llamado C20 (sc 353) (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA). Debido a que el anticuerpo 9FY reconoce específicamente proteínas ERG humanas así como de ratón, la especificidad de ERG se evaluó en tejidos incluidos en parafina fijados con formalina (FFPE) de ratones en desarrollo y adultos.

Recogida de tejidos de embriones y adultos de ratón. Se recogieron embriones de ratón a los 9,5, 14,5 y 17,5 días después del apareamiento de ratonas embarazadas y se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 12-24 horas. Se recogieron tejidos de ratón macho adulto y se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 24 horas. Los tejidos se procesaron para inclusión en parafina y usando un microtomo se cortaron secciones de 4 µm en portaobjetos doble plus superfrost.

Inmunohistoquímica (IHC) para ERG. Después de la desparafinización, se deshidrataron secciones de 4 µm y se bloquearon en peróxido de hidrógeno al 0,6 % en metanol durante 20 min. Las secciones se procesaron para la recuperación de antígenos en tampón de citrato 0,1 M durante 30 min en un microondas seguido de 30 min de enfriado. El procedimiento de IHC se llevó a cabo usando el Kit de Sistema de Detección de IHC de Ratón-a-Ratón (Millipore Inc), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se bloquearon secciones con solución de Bloqueo Pre-anticuerpo durante 10 minutos. La solución de bloqueo se retiró, y se incubaron las secciones con el anticuerpo 9FY o el anticuerpo de ERG C20 disponible en el mercado (sc 353) a una dilución de 1:1000 durante una noche a 4 °C. Después de la incubación, los portaobjetos se lavaron con PBS durante 5 minutos. Los portaobjetos se incubaron con solución de Bloqueo Post-anticuerpo durante 10 minutos y se lavaron dos veces con PBS durante 5 minutos cada una. Los portaobjetos se incubaron con el IgG Anti-Ratón/Conejo-Poli-HRP listo para usar durante 10 minutos, se lavaron con PBS durante 5 minutos, dos veces, y el color se desarrolló con reactivo DAB. Las secciones se contratiñeron después en hematoxilina durante 1 min, se deshidrataron, se clarificaron, se montaron y se fotografiaron.

Usando el anticuerpo 9FY, se detectó ERG solamente en células endoteliales de próstata de ratón de tipo silvestre y no se detectó en epitelio de próstata de ratón de tipo silvestre. La Figura 14A (las flechas sólidas marcan glándulas prostáticas y las flechas discontinuas indican células endoteliales). Por otro lado, el anticuerpo de ERG C20 (sc 353) disponible en el mercado no era específico para ERG, tiñendo células tanto endoteliales como epiteliales de próstata en tejidos obtenidos de ratones de tipo silvestre. Figura 14B. Como se esperaba, en ratones transgénicos que expresaban ERG, ambos anticuerpos detectaron ERG en células endoteliales y epiteliales de próstata. Figuras 14C-D. Sin embargo, el anticuerpo de ERG C20 (sc 353) comercial tiñe tejidos transgénicos positivos para ERG y de tipo silvestre con la misma intensidad. Figuras 14B y D.

El análisis de IHC también reveló la expresión de ERG en células hematopoyéticas, células endoteliales y en vasos sanguíneos y capilares de diversos tejidos embrionarios (datos no mostrados). De forma similar, se detectó expresión de ERG en tejidos de ratón adulto en células hematopoyéticas, células endoteliales en vasos sanguíneos y capilares (datos no mostrados). Ya se sabe que subconjuntos de AML y Sarcoma de Ewing muestran expresión de

ERG elevada. Con la disponibilidad de un anticuerpo específico de ERG, pueden buscarse eficazmente alteraciones de ERG en condiciones patológicas de células hematopoyéticas, células endoteliales en vasos sanguíneos y capilares en diferentes tejidos embrionarios. Resulta interesante que ERG no es detectable en células epiteliales normales en tejidos, incluyendo glándulas prostáticas. Por lo tanto, la detección de ERG en cualquier tejido distinto de células hematopoyéticas, o células endoteliales en vasos sanguíneos y capilares es un indicio de una anomalía y/o afección patológica, tal como cáncer.

Ejemplo 6. Secuenciación de los dominios variables del anticuerpo 9FY

Se extrajo ARN de la línea celular de hibridoma 9FY y se transcribió de forma inversa a ADNc usando un cebador oligo d(T) específico para ARN mensajero. El producto ADNc se usó como un molde para PCR usando cebadores específicos de secuencias de cadena pesada y ligera de anticuerpo murino.

Los productos de PCR se clonaron en un vector de secuenciación convencional y se identificaron colonias positivas por PCR. Estas colonias se cultivaron y se realizaron minipreparaciones con plásmidos para secuenciación. Se realizó secuenciación usando el método de terminación de colorante y se analizó en un analizador genético ABI3130. Se determinó una secuencia consenso para los dominios variables de cadena pesada y ligera por alineamiento con el programa AlignX.

Basándose en este alineamiento, se determinó que el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo 9FY comprendía la siguiente secuencia de aminoácidos (CDR1 (L1), CDR2 (L2) y CDR3 (L3) están subrayadas):

ENVLTQSPAIMSASLGEKVTLSRASSSVYYMFYQQKSDASPKLWIYYTSNLA
PGVPARFSGSGSGNSYSLSLTSSVEGEDAATYYCLQFSTSPWTFGGGKLEIKR
(SEQ ID NO:2)

Y se determinó que el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo 9FY comprendía la siguiente secuencia de aminoácidos (CDR1 (H1), CDR2 (H2) y CDR3 (H3) están subrayadas):

QIQLVQSGPDLKPKGETVKISCKASGYTFTNYGINWVKQAPGKGFKWMGWIDTY
TGEPTYVDDFKGRFVFSLETSASTAYLQINNKNEDTATYFCVRKRAYDYEIYW
GQGTPLTVSS (SEQ ID NO:3)

Ejemplo 7. Análisis del estado de la oncoproteína ERG y la fusión *TPRSS2/ERG* en cáncer de próstata

Para evaluar la relación entre la tinción de la oncoproteína ERG en muestras de ensayo de tumor y el estado de la fusión *TPRSS2-ERG*, se realizó un análisis comparativo en secciones tisulares consecutivas de las muestras de ensayo FFPE positivas para oncoproteína ERG o negativas para oncoproteína ERG para la detección de ARNm de *TPRSS2-ERG* y ARNm de *ERG* general.

Muestras de ensayo de próstata. Se obtuvieron muestras de ensayo de próstata para este análisis y para el mapeo de la expresión de ERG en cáncer de próstata multifocal (Ejemplo 8) y se prepararon de la siguiente manera. Se obtuvieron muestras de ensayo de prostatectomía radical de 132 pacientes admitidos en el programa del Centro para la Investigación de Enfermedades Prostáticas por patólogos en un periodo de 30 minutos después de haberse retirado quirúrgicamente la muestra de ensayo. Se fijaron muestras de ensayo de prostatectomía radical en formalina, se incluyeron como montajes completos en parafina, se seccionaron a intervalos de 0,22 cm en un plano transversal perpendicular al eje largo de la superficie posterior de la próstata, y se incluyeron completamente como montajes completos, de acuerdo con el protocolo de los inventores del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas (AFIP) (B. Furusato *et al.*, 2008). De cada paciente, se seleccionó una sección transversal de montaje completo que contenía de uno a cuatro tumores (principalmente dos focos) y los tumores representaron diferentes grados y estadios. Cada tumor se diagnosticó por separado en las muestras de ensayo de prostatectomía y los cortes con más de un foco tumoral representaban tumores separados.

Inmunohistoquímica para ERG. Después de la desparafinización, se deshidrataron secciones de 4 µm y se bloquearon en peróxido de hidrógeno a 0,6 % en metanol durante 20 min. Las secciones se procesaron para la recuperación de antígenos en EDTA (pH, 9,0) durante 30 min en un microondas seguido de 30 min de enfriamiento en tampón de EDTA. Después se bloquearon las secciones en suero de caballo al 1 % durante 40 minutos seguido de incubación con el anticuerpo monoclonal 9FY a una dilución de 1:1280 durante 60 min a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron con el anticuerpo anti-ratón de caballo biotinilado a una dilución de 1:200 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 30 min seguido de tratamiento con el Kit ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 30 min. La detección del color se consiguió por tratamiento con VIP (Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 5 min. Las secciones se contratiñeron después en hematoxilina durante 1 min, se

deshidrataron, se clarificaron y se montaron. La tinción de 9FY se determinó de acuerdo el porcentaje de células positivas: hasta el 25 % (1+), > 25-50 % (2+), > 50-75 % (3+) y >75 % (4+). La intensidad se puntuó como leve (1+), moderada (2+) y notable (3+). Se calculó una combinación de ambas mediciones multiplicando el porcentaje de células positivas con el grado de intensidad, que dio como resultado una puntuación.

Análisis de ARNm de ERG por amplificación de señal de ADN de cadena ramificada (ADNb). Se seleccionó una sección de 4 µm de grosor de cada una de las 35 muestras de próstata de montaje completo FFPE. Las áreas identificadas como tumores se marcaron, se retiraron por raspado y se homogeneizaron en 600 µl de Solución de Homogeneización Tisular (THS) seguido de la adición de 12 µl (50 µg/ml) de proteinasa K. Las muestras de ensayo se incubaron durante 7 h a 65 °C. Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a temperatura ambiente para sedimentar cualquier residuo. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos de microcentrifuga nuevos, evitando cualquier parafina residual. Todos los sobrenadantes se analizaron inmediatamente usando el Ensayo QUANTIGENE® 2.0 (Panomics, Fermont, CA). Cada muestra se ensayó por duplicado. Se usaron cuarenta µl (5 ng) del homogeneizado para la amplificación de ERG: 80 µl (10 ng) para *TMPRSS2-ERG* y 5 µl (0,625 ng) para genes constitutivos: ACTB, B2M y RPL19. Además, se usó ARNm de VCaP para controles positivos. Para capturar ARN diana, se prepararon diluciones de muestras combinando volúmenes apropiados de muestras en THS. Se preparó un conjunto de sondas de trabajo para cada diana combinando 12 µl del conjunto de sondas con 40 µl del reactivo de bloqueo (solamente para genes diana) o 40 µl de agua sin nucleasa (para ARN 28S), mezcla de lisis y sin nucleasa. El conjunto de sondas de trabajo se mezcló y se mantuvo a temperatura ambiente. Para preparar la placa de captura, se transfirieron 60 µl de cada conjunto de sondas de trabajo a pocillos asignados. Después se compusieron muestras de ARN y control de ensayo hasta 100 µl con Reactivo de Trabajo de Hibridación (HWR) y se hibridaron durante una noche a 55 °C. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado. Después se añadió preamplificador seguido de amplificador, sonda marcada y finalmente el sustrato de quimioluminiscencia con lavados después de la incubación en cada reactivo. Las lecturas se midieron en Luminómetro Modulus (Knudsen *et al.*, 2008).

El análisis de 35 muestras de ensayo evaluables reveló una fuerte correlación entre los niveles de ARNm del transcrito de fusión de *TMPRSS2-ERG* tipo A e inmunohistoquímica de la oncoproteína *ERG* (Fig. 15). Era evidente una concordancia del 82,8 % entre los datos de ARNm y proteína a pesar de las diferencias esperadas en la sensibilidad así como las lecturas de las dos técnicas. Una evaluación comparativa del análisis de fusión génica *TMPRSS2-ERG* por hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) y expresión de oncoproteína *ERG* por IHC (usando el anticuerpo 9FY) también apoyó estos hallazgos y no reveló discrepancias.

Ejemplo 8. Mapa de expresión de la oncoproteína ERG en cáncer de próstata multifocal

Las fusiones génicas prevalentes que implicaban secuencias reguladoras de los genes asociados a próstata regulados por receptor de andrógenos (AR) (predominantemente *TMPRSS2* y en menor grado *SLC45A3* y *NDRG1*) y secuencias codificantes de proteína de factores de transcripción nucleares en la familia del gen *ETS* (principalmente *ERG*), dan como resultado sobreexpresión frecuente de *ERG* en tumores de próstata. Estudios emergentes sugieren funciones oncogénicas de *ERG* y *ETV* en cáncer de próstata (CaP) (revisado en Kumar-Sinha, C. *et al.*, 2008; Klezovitch, O. *et al.*, 2008; Sun, C. *et al.*, 2008; Tomlins, S.A. *et al.*, 2008; Carver, B.S. *et al.*, 2009; King, J.C. *et al.*, 2009; Zong, Y. *et al.*, 2009). Estudios previos incluyendo el informe de los inventores han analizado las fusiones génicas de *ERG* a niveles genómicos o de ARNm en el contexto de cáncer multifocal y estos datos han mostrado heterogeneidad inter-tumoral dentro de la misma próstata (Clark, J. *et al.*, 2007; Barry, M. *et al.*, 2007; Mehra R. *et al.* 2007; Furusato, B. *et al.*, 2008). A pesar de numerosos informes de fusiones génicas y expresión de ARNm, aún no se ha definido la oncoproteína *ERG* en CaP.

Se usó un anticuerpo monoclonal dirigido contra el epítipo ERG 42-66 para analizar la expresión de la oncoproteína *ERG* en el contexto de CaP multifocal. Las muestras de ensayo de prostatectomía radical de 132 pacientes admitidos en un programa del Centro para la Investigación de Enfermedades Prostáticas se obtuvieron por patólogos en un periodo de 30 minutos después de haberse retirado quirúrgicamente la muestra de ensayo. Las próstatas se procesaron como montajes completos como se ha analizado anteriormente en el Ejemplo 7. De cada paciente, se seleccionó una sección transversal de montaje completo que contenía de uno a cuatro tumores (principalmente dos focos) y los tumores representaban diferentes grados y estadios. Cada tumor se diagnosticó por separado en las muestras de ensayo de prostatectomía y los cortes con más de un foco tumoral representaron tumores separados.

Cada tumor se midió y se clasificó individualmente. En promedio, una sección de montaje completo (3,5 x 2,5 cm o 4,0 x 3,5 cm) es equivalente a aproximadamente a 800-1400 núcleos de micromatriz tisular de 1 mm de diámetro. Además de los tumores de índice, la mayoría de estas secciones transversales contenían tejido prostático benigno de la zona periférica y la de transición/periuiretral así como la uretra, el utrículo, los conductos eyaculadores y las vesículas seminales. Estaba presente un único tumor en 51 secciones y estaban presentes múltiples tumores individuales en 81 secciones. El grado del tumor, el estado patológico, el estado del margen y los datos clínicos se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Características clínico-patológicas para 132 pacientes de cáncer de próstata

A			
Variables		n	%
Raza			
Caucásica		105	79,6
Afroamericana		27	20,4
Estadio de T patológico			
pT2		34	25,8
pT3-4		84	63,6
pT2r1(x) ¹		14	10,6
Puntuación de Gleason de muestra de ensayo de Prostatectomía²			
6		33	25,6
7		59	45,7
De 8 a 10		37	28,7
Estadio del margen			
Negativo		70	59,3
Positivo		48	40,7
Grado tumoral³			
Patrón de Gleason 3 (bien diferenciado)		160	61,3
Patrón de Gleason 4/5 (Moderada/escasamente diferenciado)		101	38,7
Reaparición bioquímica⁴			
No		76	65,5
Sí		40	34,5

B

Variables	n	Media $\pm$ DT	Mediana (intervalo)
Edad en el momento de la cirugía (años)	132	61,1 $\pm$ 7,4	62,3 (40,2-75,2)
Pretratamiento con PSA (ng/ml)	132	7,7 $\pm$ 4,8	6,4 (1,1-31,4)
Volumen tumoral total (cc)	132	10,4 $\pm$ 9,4	7,2 (0,03-52,8)
Seguimiento meses después de la cirugía	130	66,5 $\pm$ 35,6	67,6 (2,7-159,3)

Tabla 1. Características clínico-patológicas de pacientes de cáncer de próstata. (A) Demografía y características clínico-patológicas (categóricas) de pacientes con cáncer de próstata. ¹No se usaron datos de pacientes con tumores pT2r1(x) en este análisis. ²Corresponde a la puntuación de Gleason del tumor índice representado en la sección excepto para tres pacientes (número de Caso 83, 112 y 132). ³Apariencia histológica en las áreas observadas. ⁴Dos PSA consecutivos $\geq$ 0,2 ng/ml. **(B)** Demografía y características clínico-patológicas (continuas) de pacientes con cáncer de próstata.

Tanto en adenocarcinomas prostáticos como en PIN, las células epiteliales mostraron tinción nuclear. ERG era positivo en 117 de 261 (44,8 %) tumores individuales (Tabla 2). La tinción de ERG nuclear está prácticamente ausente en células epiteliales benignas teniendo solamente 22 de aproximadamente 200.000 glándulas benignas individuales tinción positiva para ERG, lo que demuestra la especificidad notable (>99,9 %) de este anticuerpo monoclonal de ERG en la detección de carcinoma positivo para ERG (Tabla 2). El número de glándulas benignas representa una estimación basada en el recuento del número de glándulas benignas en tres secciones de tamaño medio de esta cohorte (promedio de 1550 glándulas benignas/sección) multiplicada por 132 secciones.

Tabla 2: Frecuencia de la expresión de oncoproteína ERG en muestras de ensayo de prostatectomía de montaje completo

ERG	Tumores individuales	Glándulas Benignas
Positivo	117	22
Negativo	144	200.000
Especificidad = 99,99 %; Sensibilidad = 44,83 %; PPV 84,17 %; NPV = 99,93 %		

De 132 muestras de ensayo, solo seis muestras de ensayo mostraron células no malignas positivas para ERG poco comunes. En tres muestras de ensayo, un único grupo de glándulas benignas (promedio de 7 glándulas, variando de 5 a 8 glándulas) eran cada una positivas para ERG además de carcinoma. En tres muestras de ensayo adicionales, estaba presente ERG en agregados pequeños de glándulas nativas (de 3 a 5 glándulas) con celularidad aumentada y agrandamiento nuclear y atipia leve, cambios previamente denominados "PIN de grado bajo". Ocho de los nueve tumores de zona de transición/anterior eran negativos. En todos excepto en cinco casos, más del 85 % de las células tumorales mostraron tinción nuclear de moderada a fuerte con alteración de la coloración citoplasmática.

Ochenta y dos de ochenta y cinco (96,5 %) muestras de ensayo evaluables con focos tumorales positivos para ERG contenían lesiones de neoplasia intraepitelial prostática (PIN) positivas para ERG, y todos los focos de PIN positivos para ERG se localizaron conjuntamente con tumores positivos para ERG. La PIN es una proliferación premaligna que surge dentro de la próstata.

Ochenta y una secciones contenían múltiples tumores; en 15 de estos todos los tumores era positivos; en 31 todos los focos tumorales eran negativos y en 35 algunos tumores eran difusamente positivos y otros completamente negativos. Por lo tanto, en un contexto de tumor multifocal, 50 de 81 secciones (61,7 %) tenían uno o más tumores positivos para ERG. En las 51 secciones que contenían solamente un tumor, 46 (70,6 %) eran positivas para ERG, y dos de estas contenían clones de células tumorales completamente negativas para ERG incluidas en las áreas positivas. Se observó una tinción citoplasmática no diferenciadora débil en todos los tipos celulares epiteliales (prostáticos y no prostáticos) lo que era coherente con los datos de las líneas celulares.

El anticuerpo 9FY detectó uniformemente ERG en los núcleos de todas las células endoteliales (linfo/vascular), lo que actuó como un control positivo intrínseco para el ensayo de ERG-IHC. También se ha observado la expresión de ERG en células endoteliales previamente en otros contextos, sin embargo, su importancia aún no se ha definido (Baltzinger M. *et al.*, 1999; Birdsey, G.M. *et al.*, 2008; Ellet, F. *et al.*, 2009). Las células endoteliales pueden identificarse fácilmente por núcleos positivos para ERG sin o con muy poco citoplasma discernible en contraste con el carcinoma en el que la mayoría de las células tumorales tienen núcleos positivos para ERG y citoplasma fácilmente identificable. En carcinomas negativos para ERG escasamente diferenciados/patrón de Gleason 4 o 5, los núcleos positivos de células endoteliales tienen generalmente una distribución lineal, estrecha.

Las células tumorales con citoplasma anfifílico eran más fuertemente positivas que las de citoplasma pálido o espumoso. Tres de los cuatro tumores productores de mucina eran positivos para ERG. Solamente dos de los cinco tumores con un componente ductal eran positivos para ERG. Un tumor con apariencia de tipo sello/vacuolado era positivo para ERG. El foco con características de tipo linfoepitelioma era negativo.

En los siete pacientes con metástasis de ganglios linfáticos en el momento de la prostatectomía, la expresión de ERG reflejó el estado de expresión del tumor índice. Cuatro tumores primarios positivos para ERG tenían metástasis positivas para ERG y, por el contrario, tres tumores primarios negativos para ERG tenían metástasis negativas para ERG. Por ensayo de FISH, los tumores primarios positivos para ERG y las metástasis correspondientes mostraron patrones de fusión idénticos.

Las células basales, células uroteliales de la uretra prostática y conductos prostáticos periuretrales eran no reactivas. Los conductos eyaculadores, vesículas seminales, haces nerviosos, estroma fibromuscular, variantes de hiperplasia glandular incluyendo hiperplasia microacinar (sinónimos: adenosis, hiperplasia adenomatosa atípica), adenosis esclerosante e hiperplasia de células basales eran todos negativos para ERG. Diferentes patrones de atrofia incluyendo atrofia inflamatoria proliferativa y atrofia evolutiva o parcial también eran negativos para ERG.

Se evaluó la asociación del estado de oncoproteína ERG con diversas características clínico-patológicas (Tabla 1A y B). Sin embargo, la expresión de ERG no mostró correlación con la mayoría de las características clínico-patológicas, cuando se tuvieron en cuenta todos los focos tumorales en una sección de montaje completo dada, los tumores de mayor suma de Gleason y menos diferenciados mostraron correlación significativa con inmunotinción positiva para ERG (Tabla 3).

Tabla 3: Asociación del estado de oncoproteína ERG con la diferenciación tumoral y el patrón de Gleason de tumores individuales (N=261)

Grado tumoral	Estado de ERG		Valor de P
	Negativo (N=144)	Positivo (N=117)	
Diferenciación tumoral			
<i>Patrón de Gleason 3 (bien diferenciado)</i>	100 (62,5 %)	60 (37,5 %)	0,0027
<i>Patrón de Gleason 4/5 (moderada/escasamente diferenciado)</i>	44 (43,6 %)	57 (56,4 %)	
Suma de Gleason tumoral			0,0094
6	100 (62,5 %)	60 (37,5 %)	
7	26 (41,3 %)	37 (58,7 %)	
8-10	18 (47,4 %)	20 (52,6 %)	

Análisis estadístico. Se analizaron la sensibilidad y especificidad de la expresión de oncoproteína ERG para distinguir todos los focos tumorales de glándulas benignas en 132 próstatas de montaje completo (227 focos tumorales y más de 200.000 glándulas benignas). Se usaron el ensayo de Chi-cuadrado o el ensayo exacto de Fisher para examinar la asociación entre el estado de la oncoproteína ERG de tumor índice con características clínico-patológicas categóricas, tales como raza, estadio de T patológico, puntuación de Gleason de prostatectomía y estado del margen. También se usó el ensayo de Chi-cuadrado para ensayar la asociación del estado de oncoproteína ERG con la diferenciación de tumor para tumores individuales. Se adoptó el valor de P de 0,05 como

estadísticamente significativo. Se usó SAS versión 9.2 para todos los análisis de datos.

Dado que los acontecimientos de fusión génica en CaP implican habitualmente secuencias reguladoras de genes asociados con la próstata regulados por andrógenos, por ejemplo, *TMPRSS2*, *SLC45A3* o *NDRG1* junto con secuencias codificantes de proteínas de los factores de transcripción nuclear en la familia del gen *ETS* (*ERG*, *ETV1*, *ETV4-6* y *ELK4*), los productos proteicos resultantes son factores de transcripción oncogénicos relacionados con ETS siendo *ERG* el más común (Kumar-Sinha, C. *et al.*; 2008). Un anticuerpo monoclonal dirigido contra el epítipo *ERG* 42-66 muestra un alto grado de especificidad y sensibilidad en el reconocimiento de la oncoproteína *ERG*. La tinción nuclear positiva para la oncoproteína *ERG* es altamente específica (>99,9 %) en la identificación de células tumorales en el 65 % de los pacientes. La tinción de *ERG* nuclear está prácticamente ausente en células epiteliales benignas.

En general, el 44,8 % de los 261 tumores individuales eran positivos para *ERG* en esta cohorte, mientras que el 70,6 % de 51 muestras de ensayo con un único tumor eran positivas para *ERG* y el 62 % de 81 muestras de ensayo con más de un tumor eran positivas para *ERG*. En general las frecuencias de expresión de *ERG* en muestras de ensayo CaP observadas aquí son similares a la tasa indicada de fusiones génicas que implican el locus de *ERG* (Kumar-Sinha, C. *et al.*, 2008; Clark, J. *et al.*, 2007). Además, este estudio apunta a la contribución potencial de la desviación de las muestras en la evaluación de la frecuencia de las alteraciones de *ERG* en CaP.

En general, los tumores son de forma homogénea positivos o negativos para la expresión de *ERG*. Este estudio destaca la asociación (96,5 %) de PIN positivas para *ERG* con tumores positivos para *ERG*. Aunque otros estudios (Kumar-Sinha, C. *et al.*, 2008; Cerveira *et al.*, 2006; Perner *et al.*, 2007) han mostrado menor frecuencia de PIN positiva para fusión de *ERG* (15-20 %), este estudio de secciones de próstata de montaje completo permite una evaluación más exhaustiva de PIN y tumores en el contexto de la expresión de oncoproteína *ERG*.

Las glándulas benignas positivas para *ERG* poco comunes y las glándulas nativas atípicas poco comunes, denominadas PIN de grado bajo, pueden albergar alteraciones moleculares sub-morfológicas, particularmente a la vista de su relación topográfica con PIN y/o carcinoma. Este hallazgo está de acuerdo con estudios previos que indican la presencia de transcritos de fusión *TMPRSS2-ERG* en casos poco comunes de glándulas prostáticas benignas (Clark, J. *et al.*, 2007; Furusato, B. *et al.*, 2008). La confirmación de fusiones *TMPRSS2-ERG* en estos focos es difícil debido a su pequeño tamaño. Cuando se considera la alta tasa de concordancia entre la expresión de oncoproteína *ERG* y el estado de transcrito de fusión génica *TMPRSS2-ERG*, podría emplearse la IHC de *ERG* como un marcador sustitutivo excelente para fusiones génicas que conducen a la sobreexpresión de *ERG*. Por lo tanto, además de complementar los ensayos basados en ARNm y genómicos, la detección de oncoproteína *ERG* usando los anticuerpos descritos en el presente documento que se unen con el epítipo 42-66 proporciona un avance significativo en la evaluación de las alteraciones de *ERG* en CaP. Por ejemplo, pueden detectarse productos de traducción resultantes de acontecimientos de fusión genómica de secuencia codificante de proteína *ERG* y secuencia reguladora de cualquier compañero de fusión 5' (*TMPRSS2*, *SLC45A3* y *NDRG1*) (Petrovics, G. *et al.*, 2005; Han, B. *et al.*, 2008; Pflueger, D. *et al.*, 2009) por Mab-*ERG*. Desde el punto de vista práctico, la evaluación de la proteína *ERG* por IHC será más rápida e informativa para la evaluación morfológica de la activación oncogénica de *ERG* en una situación de patología "frontal".

Entre los marcadores de diagnóstico usados en la actualidad, la alfa-metilacil-CoA racemasa (AMACR) detecta aproximadamente el 80 % de carcinomas prostáticos y otros diversos carcinomas (Hameed, O. *et al.*, 2005). Sin embargo, la especificidad de AMACR es menor que la del *ERG*, debido a que el 25-30 % de las glándulas prostáticas benignas pueden teñirse con respecto a AMACR. Por lo tanto, la inclusión de un anticuerpo que se une con el epítipo *ERG* 42-66 en un panel de IHC de diagnóstico puede aumentar la especificidad para detección de tumores. La reacción positiva fuerte del anticuerpo 9FY en células endoteliales destaca muchos más capilares en la próstata de los que se han apreciado previamente usando marcadores celulares endoteliales convencionales (CD 31, CD 34 y antígenos relacionados con el Factor VIII). Esta característica de la expresión de *ERG* podría complicar potencialmente la interpretación de la tinción de IHC de *ERG*. Por ejemplo, los capilares en contacto íntimo con glándulas pueden sugerir tinción de células basales o los capilares dilatados con endotelio reactivo pueden imitar glándulas tumorales pequeñas o atrofia. Sin embargo, esta complicación potencial puede superarse mediante la experiencia reconociendo patrones vasculares positivos para *ERG*.

Aunque aún no se entienden bien las características de pronóstico de las alteraciones de *ERG* en CaP, se han indicado asociaciones tanto positivas como negativas (Kumar-Sinha, C. *et al.*, 2008; Clark, J. *et al.*, 2007). En esta evaluación de la oncoproteína *ERG*, cuando se tienen en cuenta todos los focos tumorales en una sección de montaje completo dada, los tumores de mayor suma de Gleason y menos diferenciados mostraron correlación con la inmunotinción de *ERG* (Tabla 3). Sin embargo, no hubo correlación significativa con la progresión (datos no mostrados). Considerando la expresión de *ERG* en el contexto de tumor multifocal, son necesarias evaluaciones independientes adicionales en cohortes mayores y mejor definidas.

En resumen, entre los biomarcadores de proteína de CaP conocidos actualmente, la detección de la oncoproteína *ERG* homogénea, fuerte y altamente específica ofrece oportunidades sin precedentes en la situación de diagnóstico de CaP. Estos hallazgos confirman el papel de la activación de *ERG* en la selección clonal y expansión de células tumorales positivas para *ERG* durante la transición de CaP pre-invasivo a invasivo en dos tercios de los pacientes.

Finalmente, con un mejor entendimiento de las funciones de ERG en la biología del tumor de próstata, puede usarse estratificación basada en anticuerpos monoclonales de ERG de tumores de próstata en el futuro en el contexto de captura de imágenes, terapia dirigida o control de la eficacia de la terapia de ablación de andrógenos.

5 REFERENCIAS

Las siguientes referencias se citan en la solicitud y proporcionan información general sobre el campo de la invención y proporcionan ensayos y otros detalles analizados en la solicitud.

- 10 Attard, G. *et al.* (2008). *Oncogene* 27, 253-263.
- Baltzinger, M. *et al.* (1999). *Dev Dyn* 216, 420-433.
- Barry, M. *et al.* (2007). *Urology* 70, 630-633.
- 15 Beach, R. *et al.* (2002). *Am J Surg Pathol* 26, 1588-1596.
- Birdsey, G.M. *et al.* (2008). *Blood* 111, 3498-3506.
- 20 Carver, B.S. *et al.* (2009). *Nat Genet* 41, 619-624.
- Cerveira, N. *et al.*, (2006) *Neoplasia* 8, 826-832.
- Clark, J. *et al.* (2007). *Oncogene* 26, 2667-2673.
- 25 Egevad, L. (2008). *Anal Quant Cytol Histol* 30, 190-198.
- Ellett, F. *et al.* (2009). *Mech Dev* 126, 220-229.
- 30 FitzGerald, L.M. *et al.* (2008). *BMC Cancer* 8, 230.
- Furusato, B. *et al.* (2008). *Mod Pathol* 21, 67-75.
- Furusato, B. *et al.* (2008). *Prostate Cancer Prostatic Dis* 11, 194-197.
- 35 Gopalan, A. *et al.* (2009). *Cancer Res* 69, 1400-1406.
- Gupta, A. *et al.* (2004). *Am J Surg Pathol* 28, 1224-1229.
- 40 Hameed, O *et al.*, (2005). *Am J Surg Pathol* 29, 579-587.
- Han, B. *et al.*, (2008) *Cancer Res* 68, 7629-7637.
- Hermans, K.G., *et al.* (2009). *Clin Cancer Res* 15, 6398-6403.
- 45 Hu, Y. *et al.* (2008). *Clin Cancer Res* 14, 4719-4725.
- Jiang, Z. *et al.* (2001). *Am J Surg Pathol* 25, 1397-1404.
- 50 King, J.C. *et al.*, (2009). *Nat Genet* 41, 524-526.
- Klezovitch, O. *et al.* (2008). *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2105-2110.
- B. S. Knudsen, A. N. *et al.* (2008). *J Mol Diagn* 10, 169-176.
- 55 Koeffler, H.P., y Golde, D.W. (1978). *Science* 200, 1153-1154.
- Kubo, J. *et al.* (2003). *Am J Pathol* 163, 571-581.
- 60 Kumar-Sinha, C. *et al.* (2008). *Nat Rev Cancer* 8, 497-511.
- Larkin, M.A. *et al.* (2007). *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
- Luo, J. *et al.* (2002). *Cancer Res* 62, 2220-2226.
- 65 McLaughlin, F. *et al.* (1999). *J Cell Sci* 112 (Pt 24), 4695-4703.

Mehra, R. *et al.* (2007). *Cancer Res* 67, 7991-7995.

Mehra, R. *et al.* (2008). *Cancer Res* 68, 3584-3590.

Minowada, J. *et al.* (1972). *J Natl Cancer Inst* 49, 891-895.

Mostofi, F.K. *et al.* (1992). *Cancer* 70, 235-253.

Mostofi, F.K. *et al.* (1993). *Cancer* 71, 906-932.

Murakami, K. *et al.* (1993). *Oncogene* 6, 1559-1566.

Narod, S.A. *et al.* (2008). *Br J Cancer* 99, 847-851.

Ng, A.P. *et al.* (2010). Trisomy of Erg is required for myeloproliferation in mouse model of Down syndrome Blood, en prensa.

Owczarek, C.M. *et al.* (2004). *Gene* 324, 65-77.

Perner, S. *et al.*, (2007). *Am J Surg Pathol* 31, 882-888.

Petrovics, G. *et al.*, (2005). *Oncogene* 24, 3847-3852.

Pflueger, D. *et al.* (2009). *Neoplasia* 11, 804-811.

Quinn, L.A. *et al.* (1979). *Cancer Res* 39, 4914-4924.

Rainis, L. *et al.* (2005). *Cancer Res* 65, 7596-7602.

Rao, V.N. *et al.* (1987a). *Science* 237, 635-639.

Rao, V.N. *et al.* (1987b). *Oncogene Res* 2, 95-101.

Reddy, E.S. *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 6131-6135.

Rubin, M.A. *et al.* (2002). *JAMA* 287, 1662-1670.

Saramaki, O.R. *et al.* (2008). *Clin Cancer Res* 14, 3395-3400.

Shim *et al.* (2003). *J. Neural Trans. Supl.* 67:39-49.

Sun, C. *et al.* (2008). *Oncogene* 27, 5348-5353.

Tomlins, S.A. *et al.* (2005). *Science* 310, 644-647.

Tomlins, S.A. *et al.* (2008). *Neoplasia* 10, 177-188.

Turner, D.P. y Watson, D.K. (2008). *Expert Rev Anticancer Ther* 8, 33-42.

Wang *et al.* *Cancer Res.* (2008). 68, 8516-24.

Winnes, M. *et al.*, (2007). *Oncol Rep* 17, 1033-1036.

Yang, X.J. *et al.* (2002). *Am J Surg Pathol* 26, 921-925.

Zong, Y., *et al.* (2009). *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 12465-12470.

Documento WO 2007/033187

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> THE HENRY M. JACKSON FOUNDATION FOR THE ADVANCEMENT OF MILITARY MEDICINE, INC.

<120> ANTICUERPOS MONOCLONALES DE ERG

<130> HMJ-109-PCT

<140>

<141>

<150> 61/173,834

<151> 29-04-2009

<160> 9

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 479

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Met Ala Ser Thr Ile Lys Glu Ala Leu Ser Val Val Ser Glu Asp Gln
1 5 10 15

Ser Leu Phe Glu Cys Ala Tyr Gly Thr Pro His Leu Ala Lys Thr Glu
20 25 30

Met Thr Ala Ser Ser Ser Ser Asp Tyr Gly Gln Thr Ser Lys Met Ser
35 40 45

Pro Arg Val Pro Gln Gln Asp Trp Leu Ser Gln Pro Pro Ala Arg Val
50 55 60

Thr Ile Lys Met Glu Cys Asn Pro Ser Gln Val Asn Gly Ser Arg Asn
65 70 75 80

Ser Pro Asp Glu Cys Ser Val Ala Lys Gly Gly Lys Met Val Gly Ser
85 90 95

Pro Asp Thr Val Gly Met Asn Tyr Gly Ser Tyr Met Glu Glu Lys His
100 105 110

Met Pro Pro Pro Asn Met Thr Thr Asn Glu Arg Arg Val Ile Val Pro
115 120 125

Ala Asp Pro Thr Leu Trp Ser Thr Asp His Val Arg Gln Trp Leu Glu
130 135 140

Trp Ala Val Lys Glu Tyr Gly Leu Pro Asp Val Asn Ile Leu Leu Phe
145 150 155 160

Gln Asn Ile Asp Gly Lys Glu Leu Cys Lys Met Thr Lys Asp Asp Phe
 165 170 175
 Gln Arg Leu Thr Pro Ser Tyr Asn Ala Asp Ile Leu Leu Ser His Leu
 180 185 190
 His Tyr Leu Arg Glu Thr Pro Leu Pro His Leu Thr Ser Asp Asp Val
 195 200 205
 Asp Lys Ala Leu Gln Asn Ser Pro Arg Leu Met His Ala Arg Asn Thr
 210 215 220
 Gly Gly Ala Ala Phe Ile Phe Pro Asn Thr Ser Val Tyr Pro Glu Ala
 225 230 235 240
 Thr Gln Arg Ile Thr Thr Arg Pro Asp Leu Pro Tyr Glu Pro Pro Arg
 245 250 255
 Arg Ser Ala Trp Thr Gly His Gly His Pro Thr Pro Gln Ser Lys Ala
 260 265 270
 Ala Gln Pro Ser Pro Ser Thr Val Pro Lys Thr Glu Asp Gln Arg Pro
 275 280 285
 Gln Leu Asp Pro Tyr Gln Ile Leu Gly Pro Thr Ser Ser Arg Leu Ala
 290 295 300
 Asn Pro Gly Ser Gly Gln Ile Gln Leu Trp Gln Phe Leu Leu Glu Leu
 305 310 315 320
 Leu Ser Asp Ser Ser Asn Ser Ser Cys Ile Thr Trp Glu Gly Thr Asn
 325 330 335
 Gly Glu Phe Lys Met Thr Asp Pro Asp Glu Val Ala Arg Arg Trp Gly
 340 345 350
 Glu Arg Lys Ser Lys Pro Asn Met Asn Tyr Asp Lys Leu Ser Arg Ala
 355 360 365
 Leu Arg Tyr Tyr Tyr Asp Lys Asn Ile Met Thr Lys Val His Gly Lys
 370 375 380
 Arg Tyr Ala Tyr Lys Phe Asp Phe His Gly Ile Ala Gln Ala Leu Gln
 385 390 395 400
 Pro His Pro Pro Glu Ser Ser Leu Tyr Lys Tyr Pro Ser Asp Leu Pro

	405		410		415
Tyr Met Gly Ser Tyr His Ala His Pro Gln Lys Met Asn Phe Val Ala					
	420		425		430
Pro His Pro Pro Ala Leu Pro Val Thr Ser Ser Ser Phe Phe Ala Ala					
	435		440		445
Pro Asn Pro Tyr Trp Asn Ser Pro Thr Gly Gly Ile Tyr Pro Asn Thr					
	450		455		460
Arg Leu Pro Thr Ser His Met Pro Ser His Leu Gly Thr Tyr Tyr					
	465		470		475

<210> 2

<211> 107

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

10

<400> 2

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

15 <210> 3

<211> 118

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 3

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Asp Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Gly Ile Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Phe Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Val Asp Asp Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Val Arg Lys Arg Ala Tyr Asp Tyr Glu Ile Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Pro Leu Thr Val Ser Ser
115

5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

15 <400> 4

Ser Ser Val Tyr Tyr
1 5

<210> 5

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 5

Leu Gln Phe Ser Thr Ser Pro Trp Thr
1 5

30

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 6

10

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly
1 5

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 7

20

Ile Asp Thr Tyr Thr Gly Glu Pro
1 5

25

<210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 8

35

Val Arg Lys Arg Ala Tyr Asp Tyr Glu Ile Tyr
1 5 10

<210> 9
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

45

<400> 9

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo que se une con el epítipo de proteína de protooncogén de gen relacionado con ETS (ERG) formado por los restos de aminoácidos 42-66 de SEQ ID NO: 1 y comprende un dominio variable de cadena ligera y un dominio variable de cadena pesada, en el que el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.
- 10 2. Una construcción que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 1, en el que la construcción es un plásmido, un vector, un fagémido o un casete de expresión o transcripción.
3. Una célula hospedadora que comprende la construcción de la reivindicación 2.
- 15 4. Un anticuerpo monoclonal que se une con un epítipo de ERG formado por los restos de aminoácidos 42-66 de SEQ ID NO: 1 para su uso para el tratamiento de un tumor maligno en un sujeto, en el que el tumor maligno es provocado por un acontecimiento de fusión de *ERG* y/o sobreexpresión de *ERG*.
- 20 5. El anticuerpo monoclonal para el uso de la reivindicación 4, en el que el acontecimiento de fusión de ERG comprende una fusión entre una secuencia promotora de genes *TMPRSS2*, *SLC45A3* o *NDRG1* y una secuencia génica de *ERG*.
- 25 6. El anticuerpo monoclonal para el uso de la reivindicación 4 o 5, en el que el tumor maligno es cáncer de próstata, sarcoma de Ewing, leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica T aguda, leucemia megacarioblástica, cáncer de colon o cáncer endotelial.
- 30 7. El anticuerpo monoclonal para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en el que el anticuerpo monoclonal comprende un dominio variable de cadena ligera que comprende las tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) de SEQ ID NO: 2 y un dominio variable de cadena pesada que comprende las tres CDR de SEQ ID NO: 3.
- 35 8. El anticuerpo monoclonal para el uso de la reivindicación 7, en el que el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.
- 40 9. El anticuerpo monoclonal para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4-8, en el que dicho anticuerpo compite con un polipéptido que consiste en los aminoácidos 42-66 por la unión con un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.
10. El anticuerpo monoclonal para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4-9, en el que dicho anticuerpo inhibe de forma competitiva la unión de un anticuerpo que tiene un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 con un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

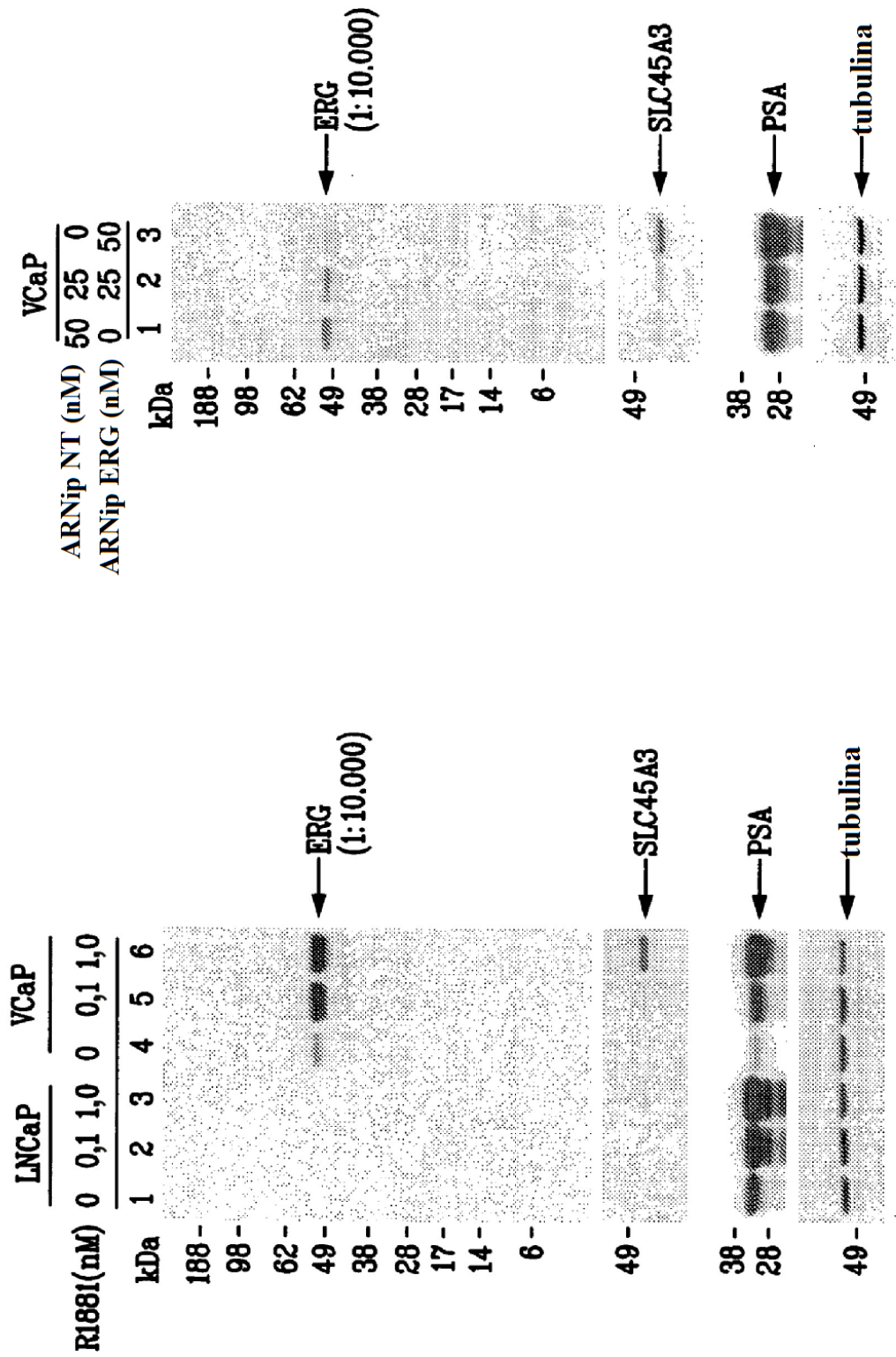


FIG. 1A

FIG. 1B

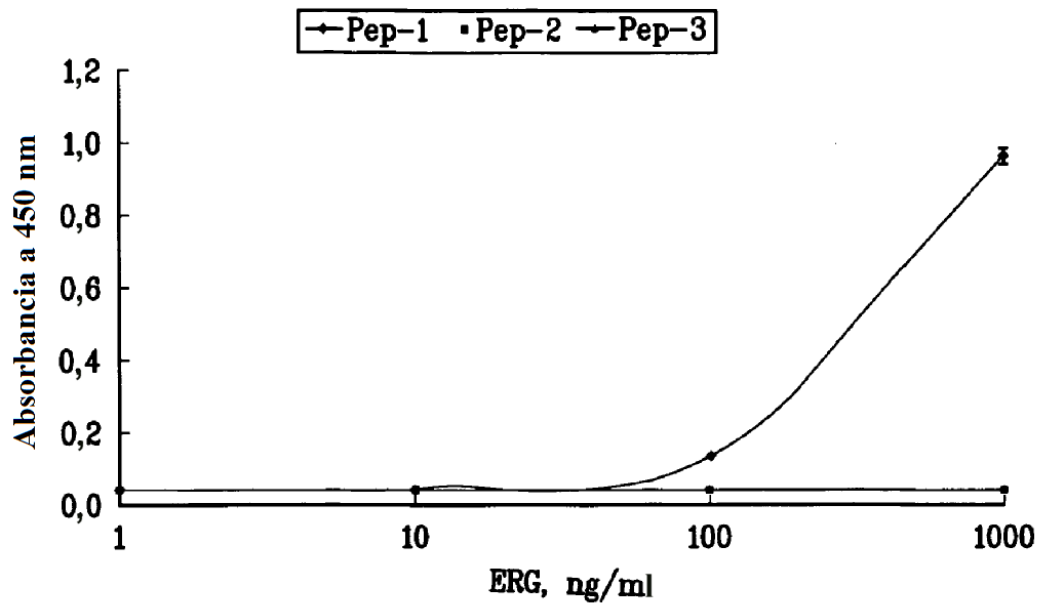


FIG. 2A

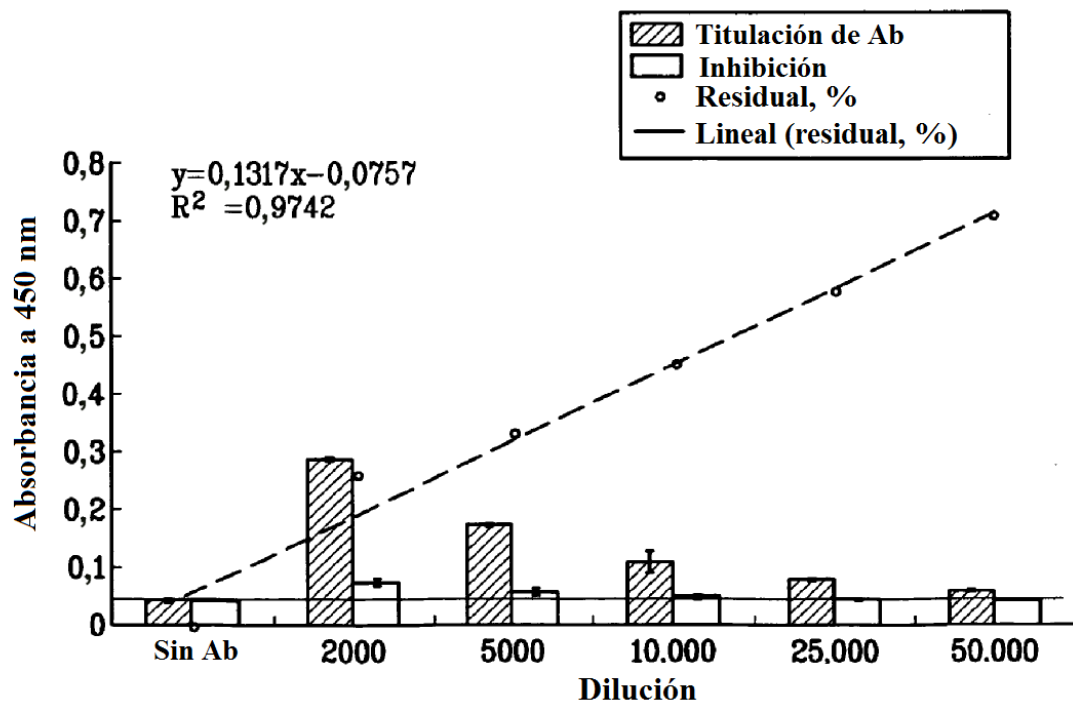


FIG. 2B

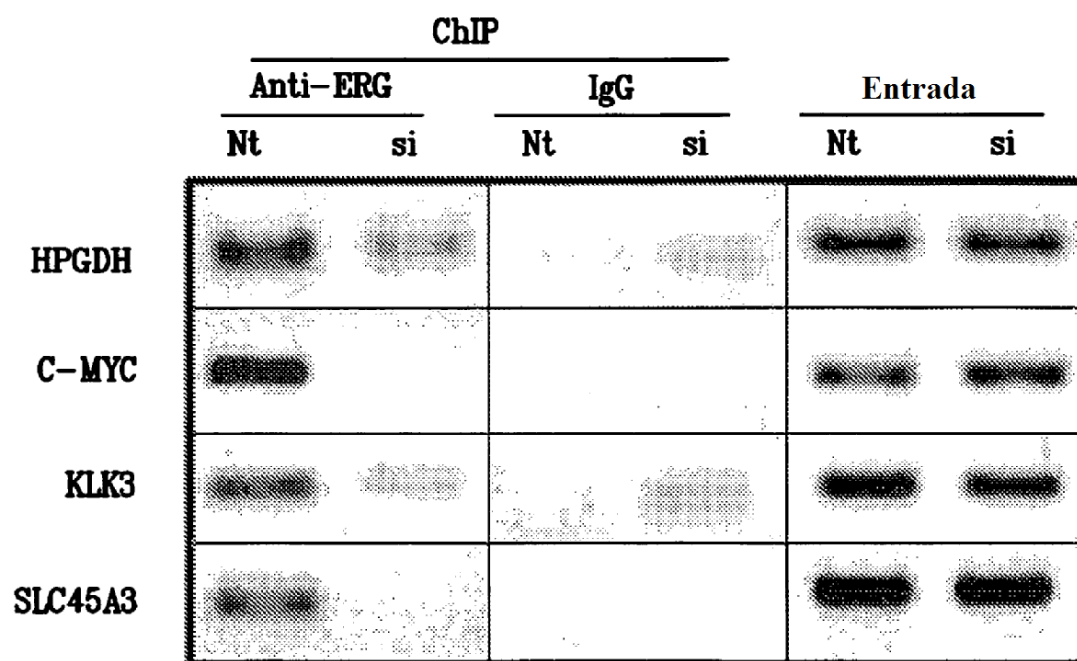
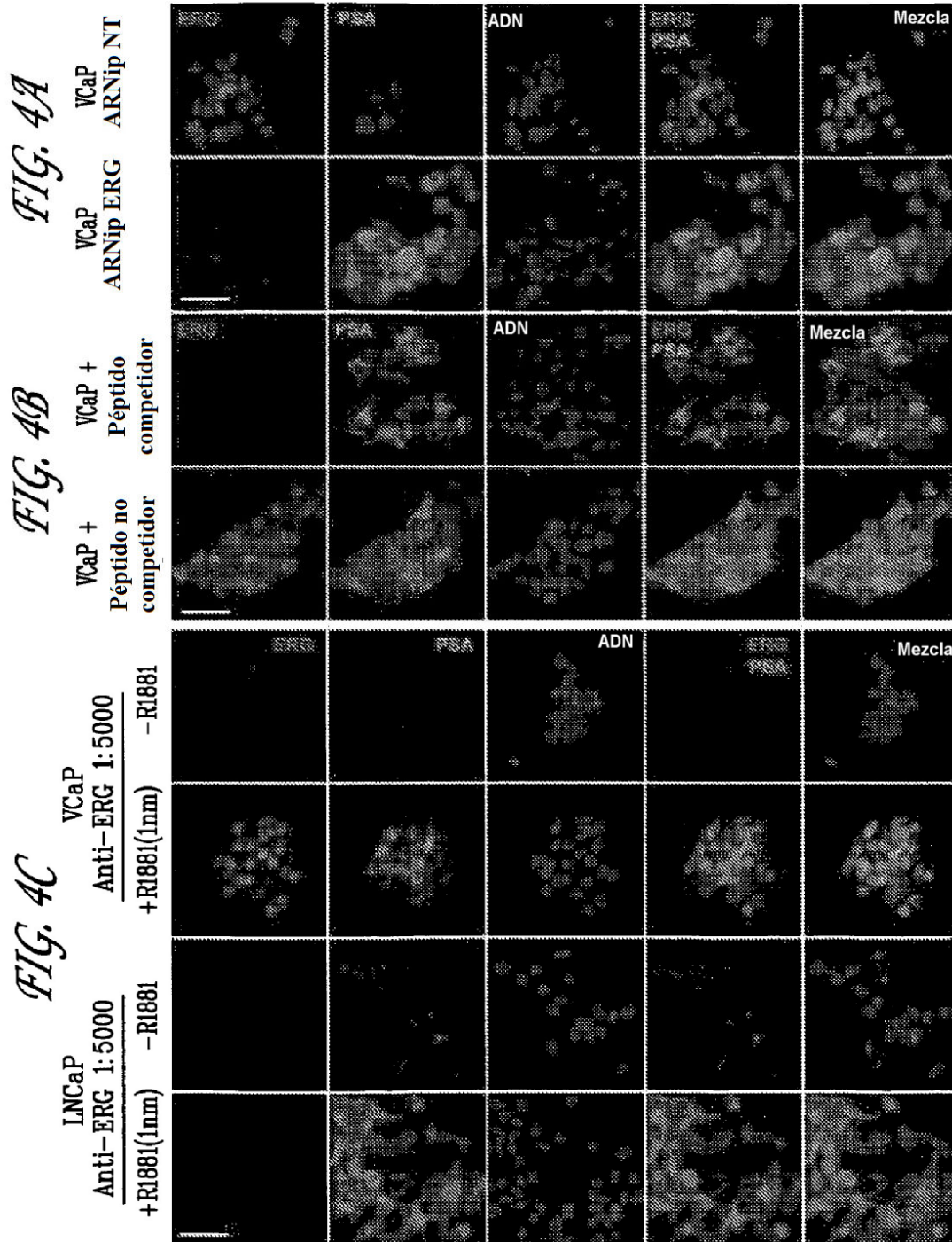


FIG. 3



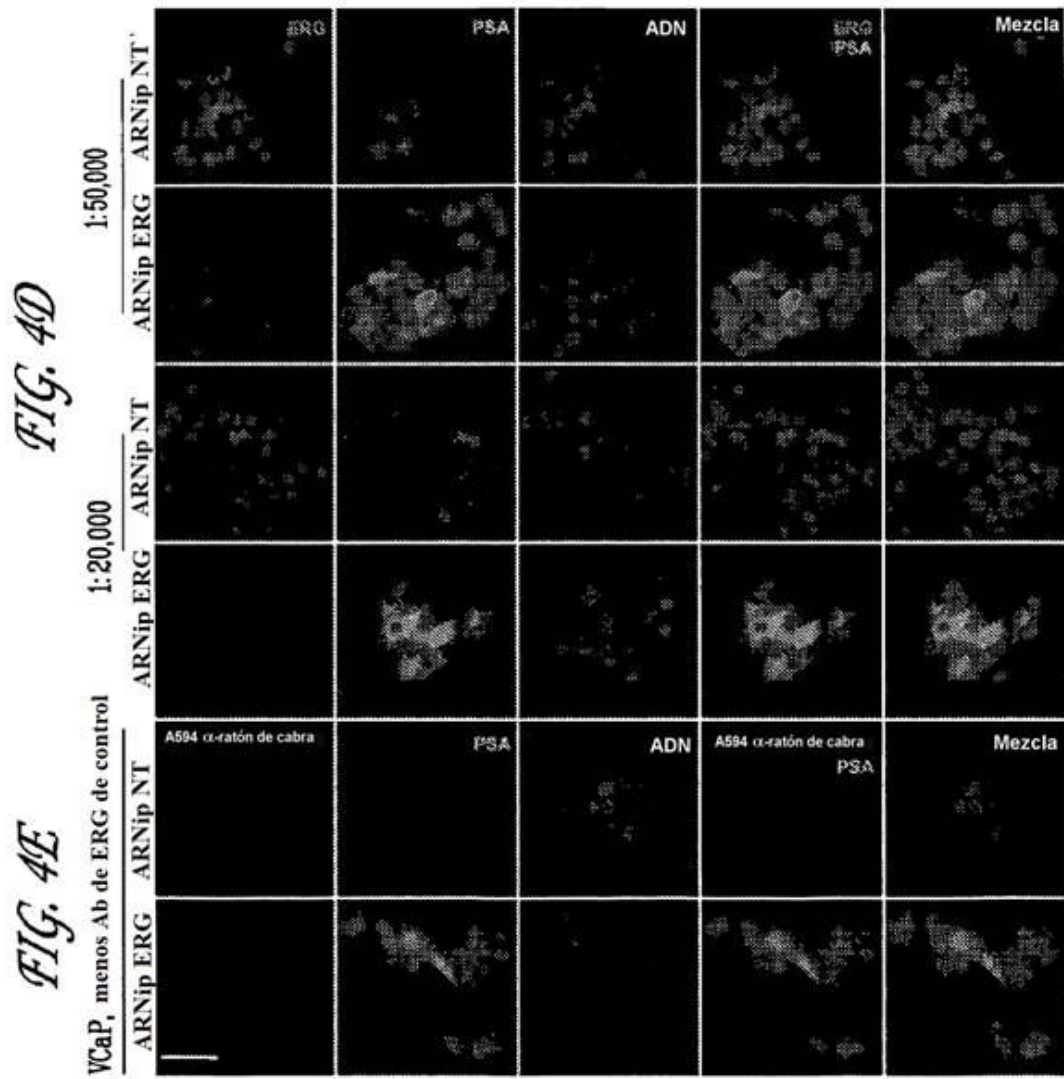


FIG. 5A

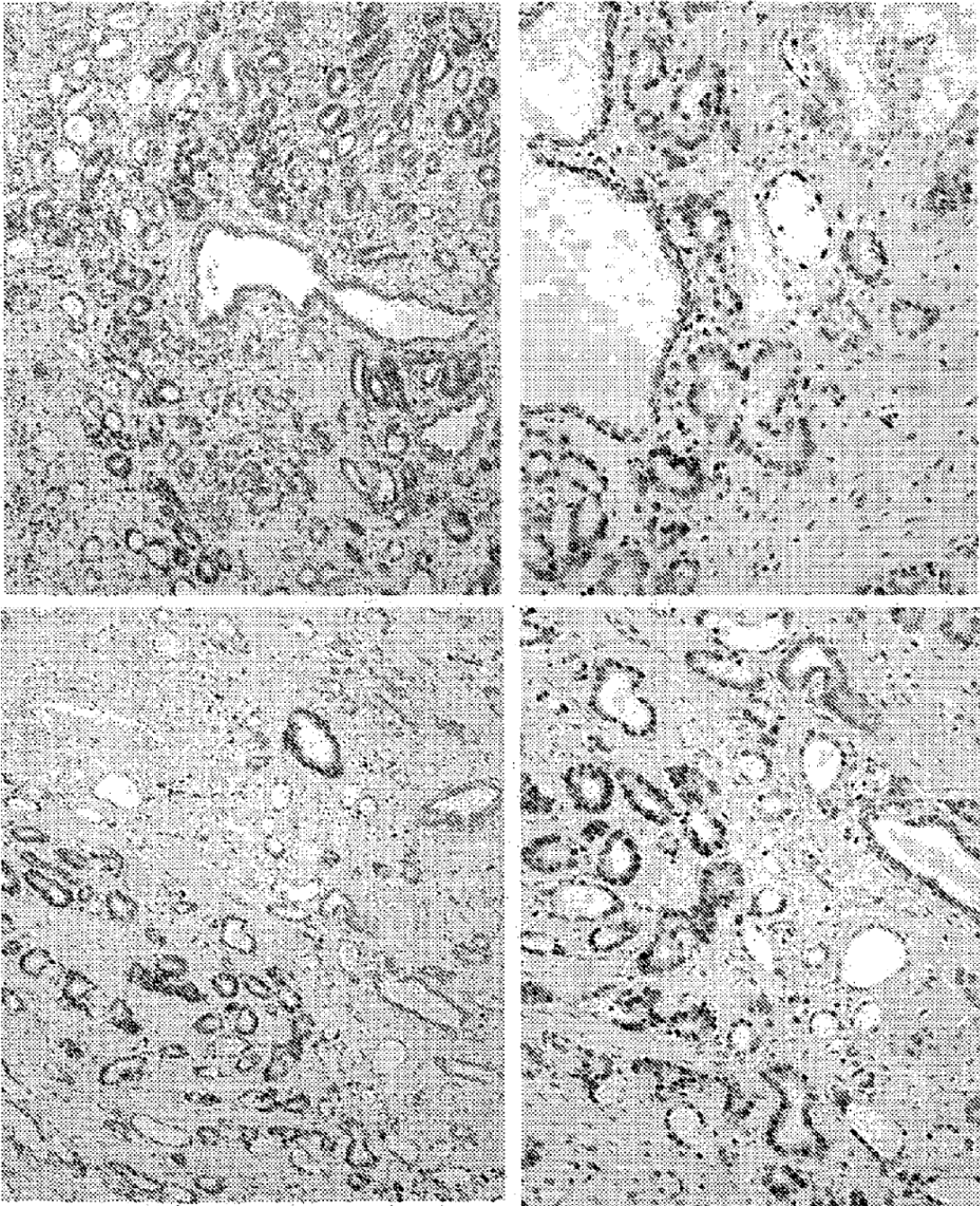
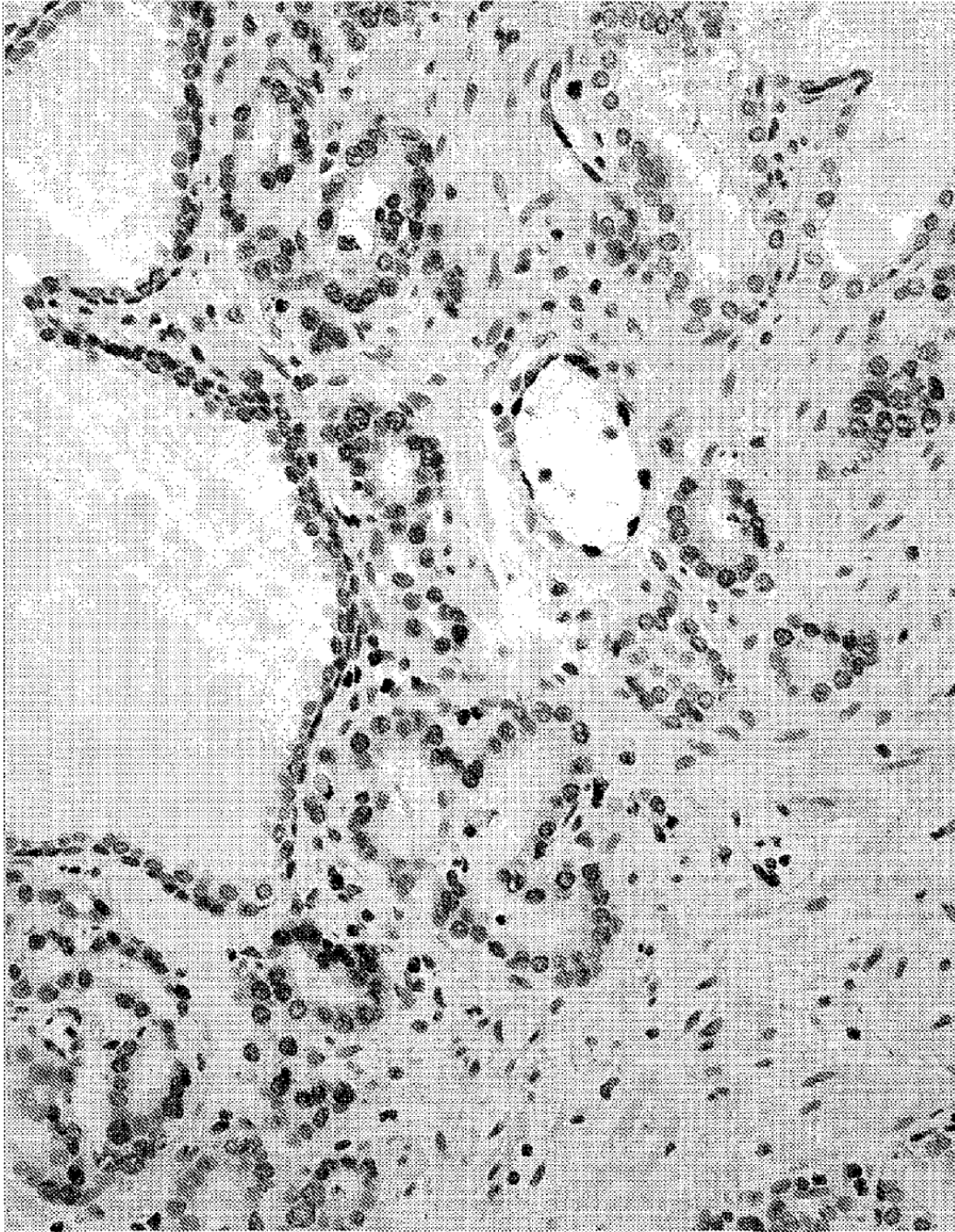


FIG. 5B



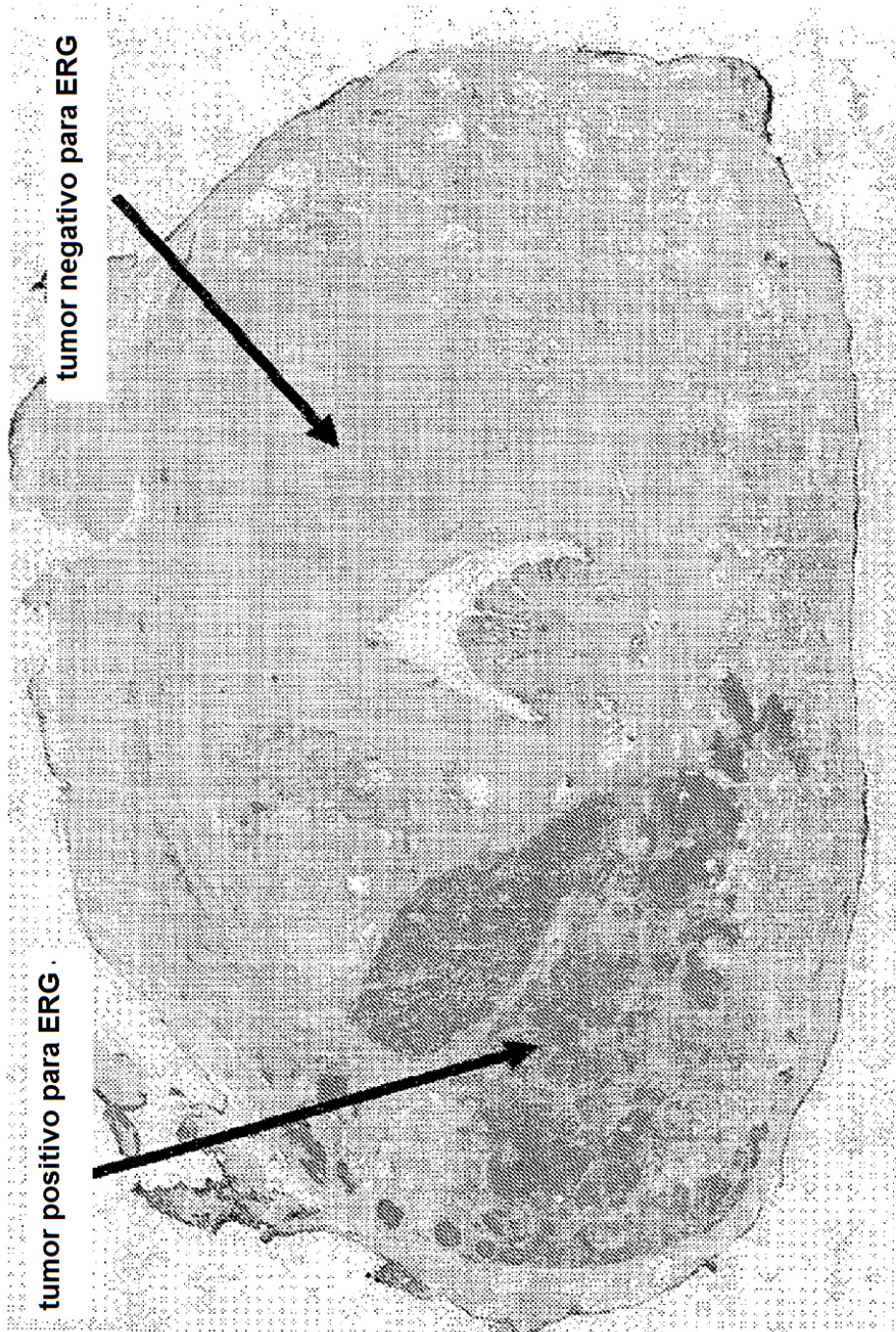
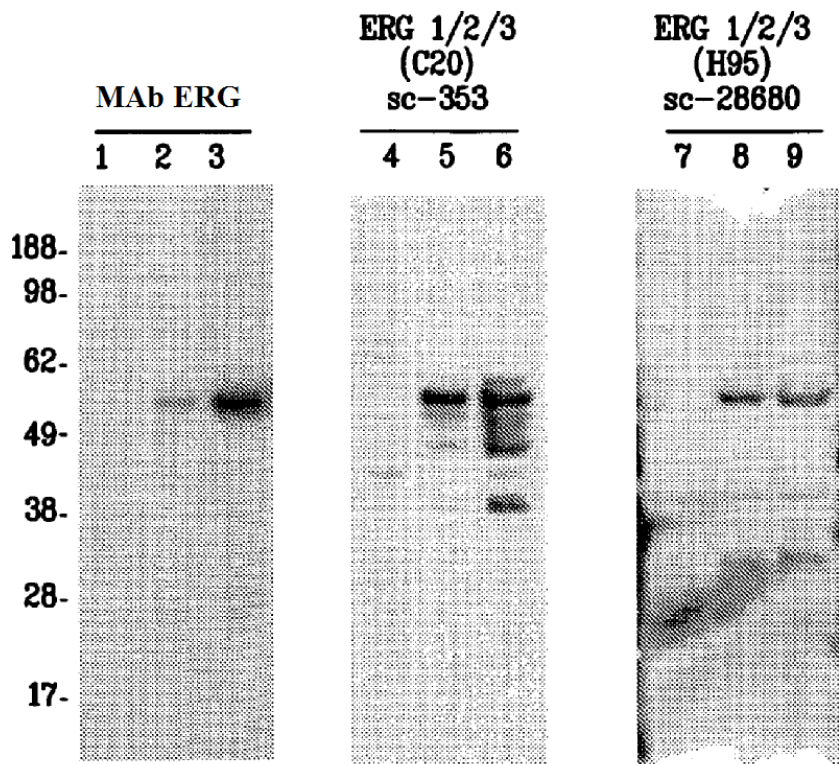
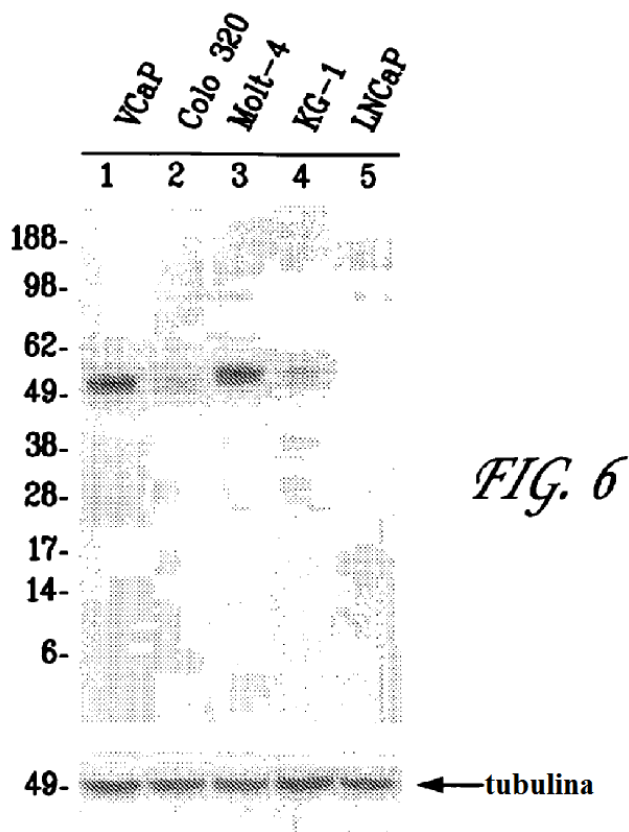


FIG. 5C



FIG. 5D



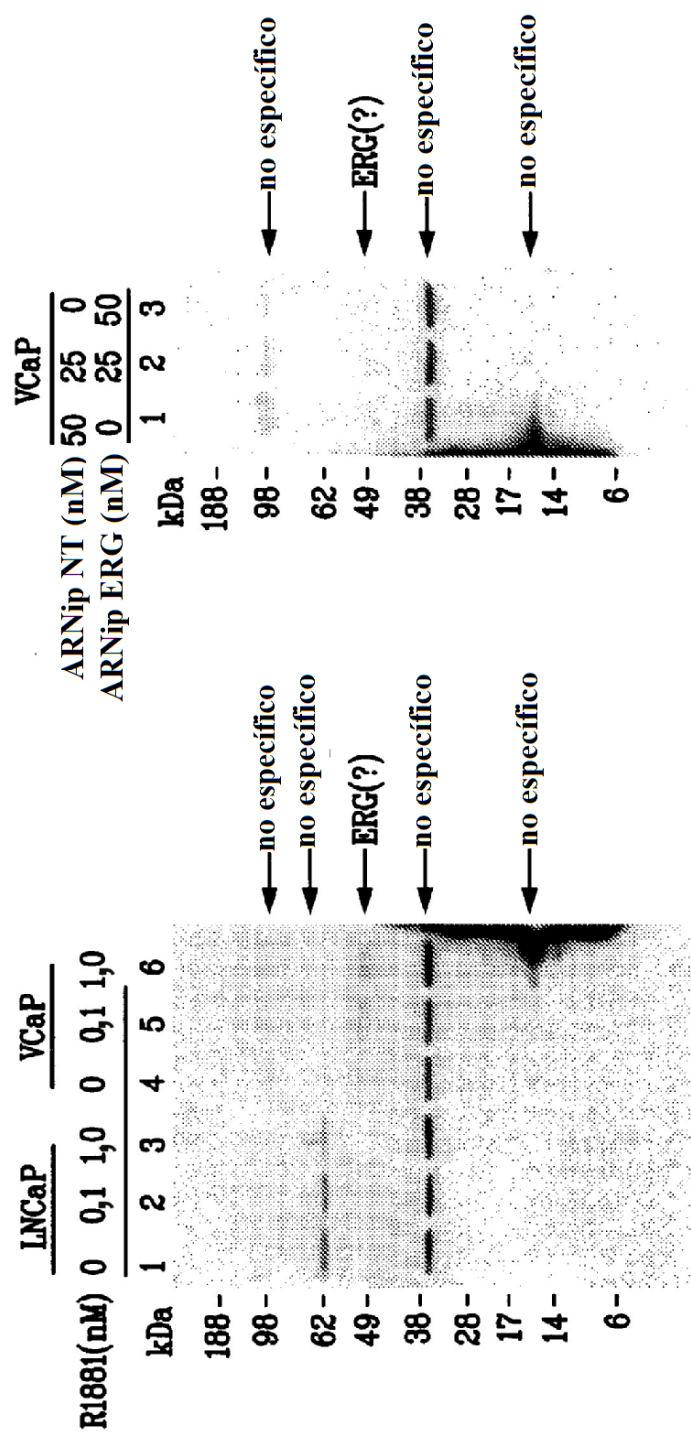


FIG. 8A

FIG. 8B

FIG. 9A

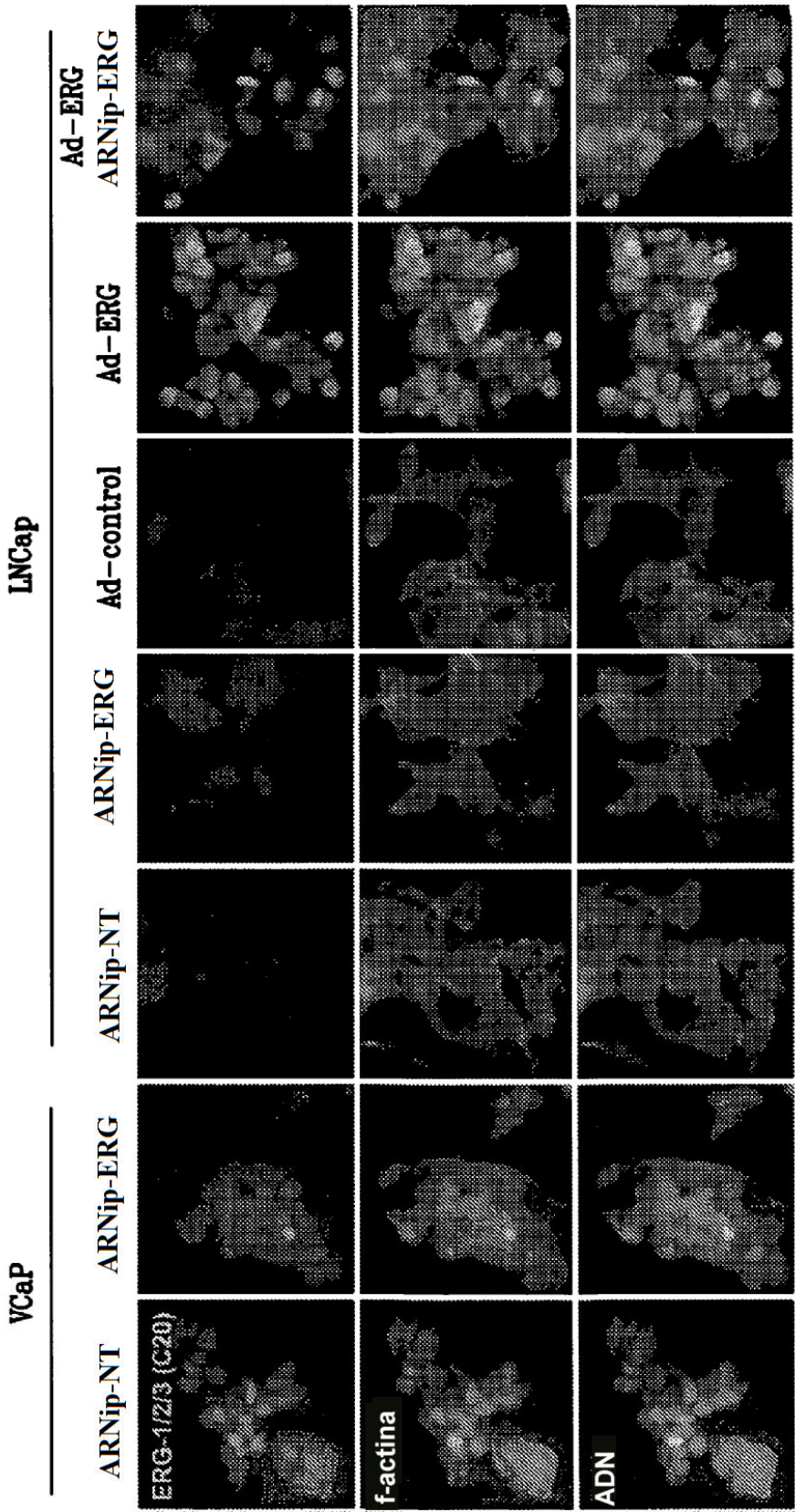


FIG. 9B

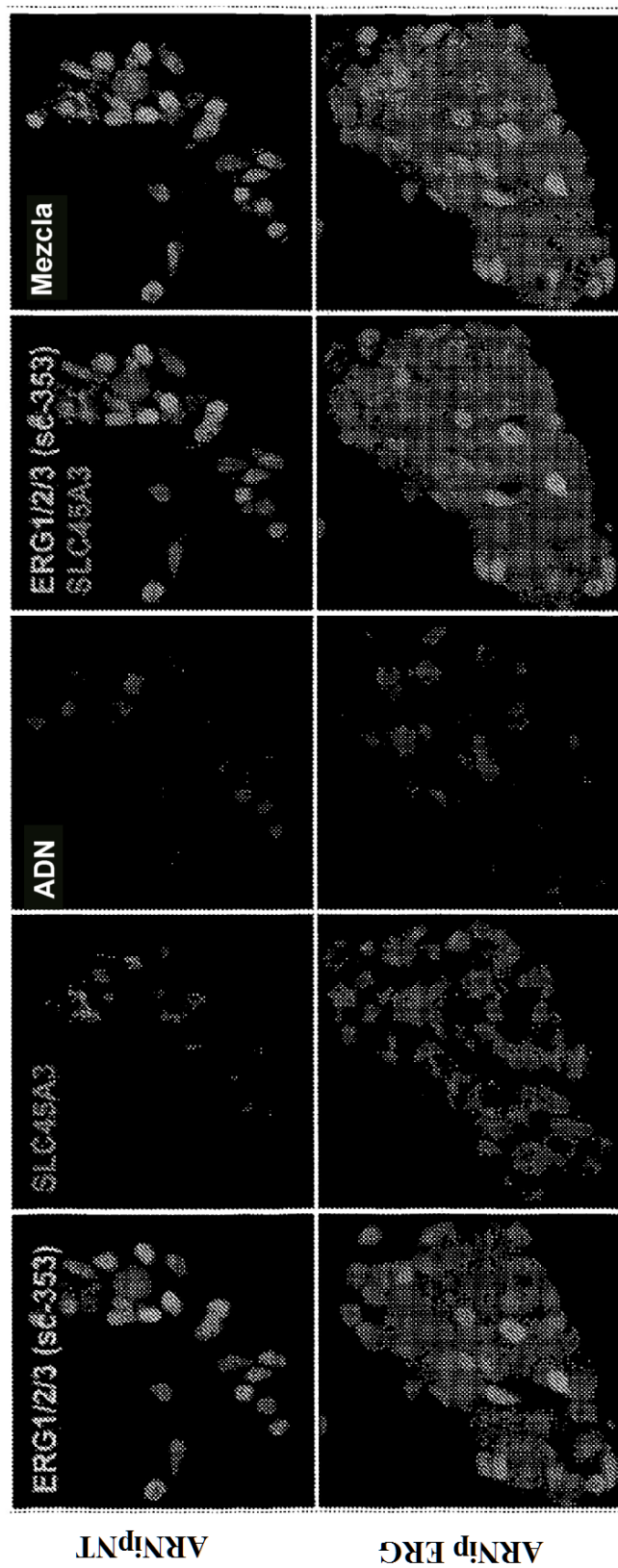


FIG. 10

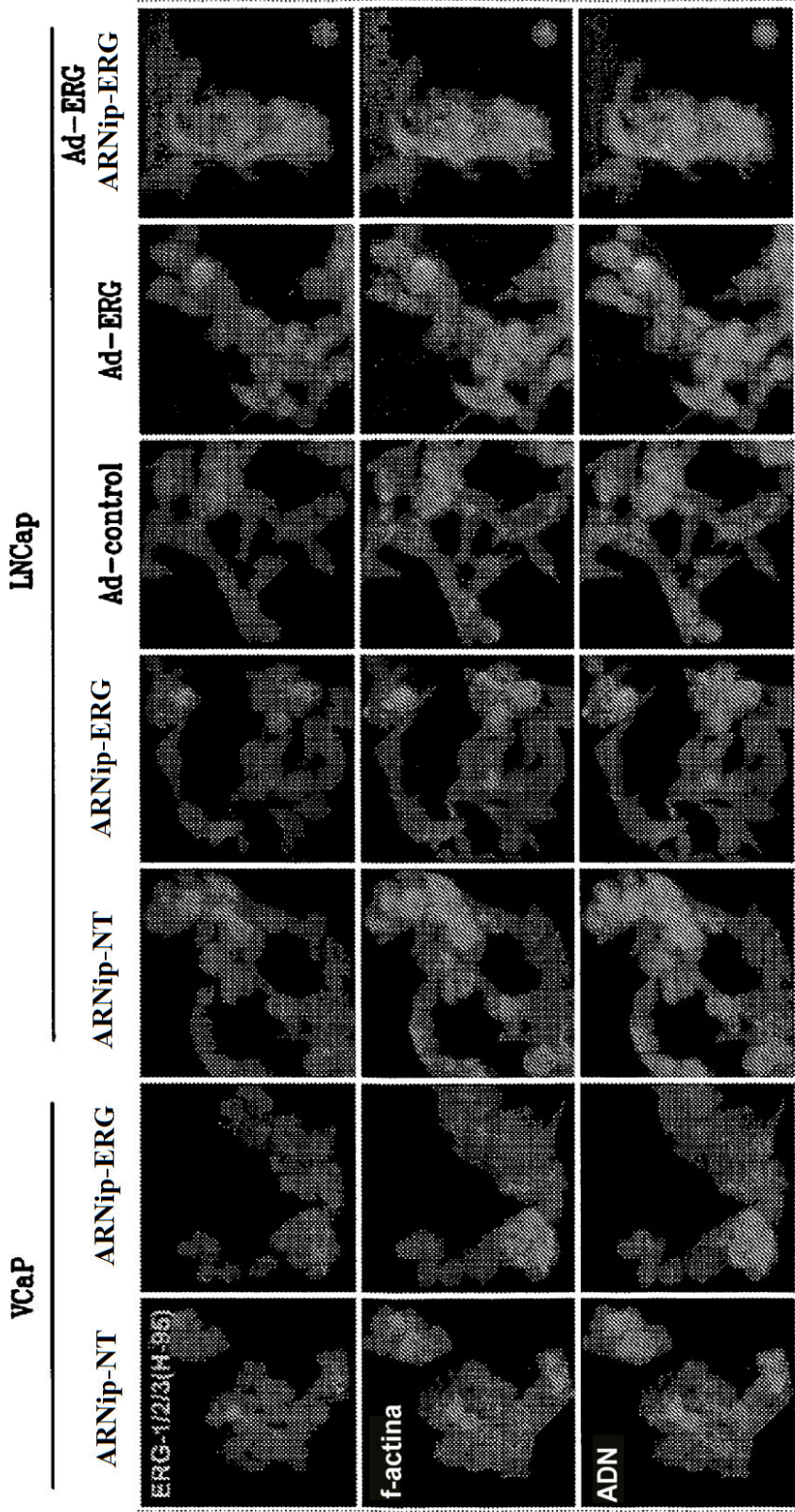


FIG. 11

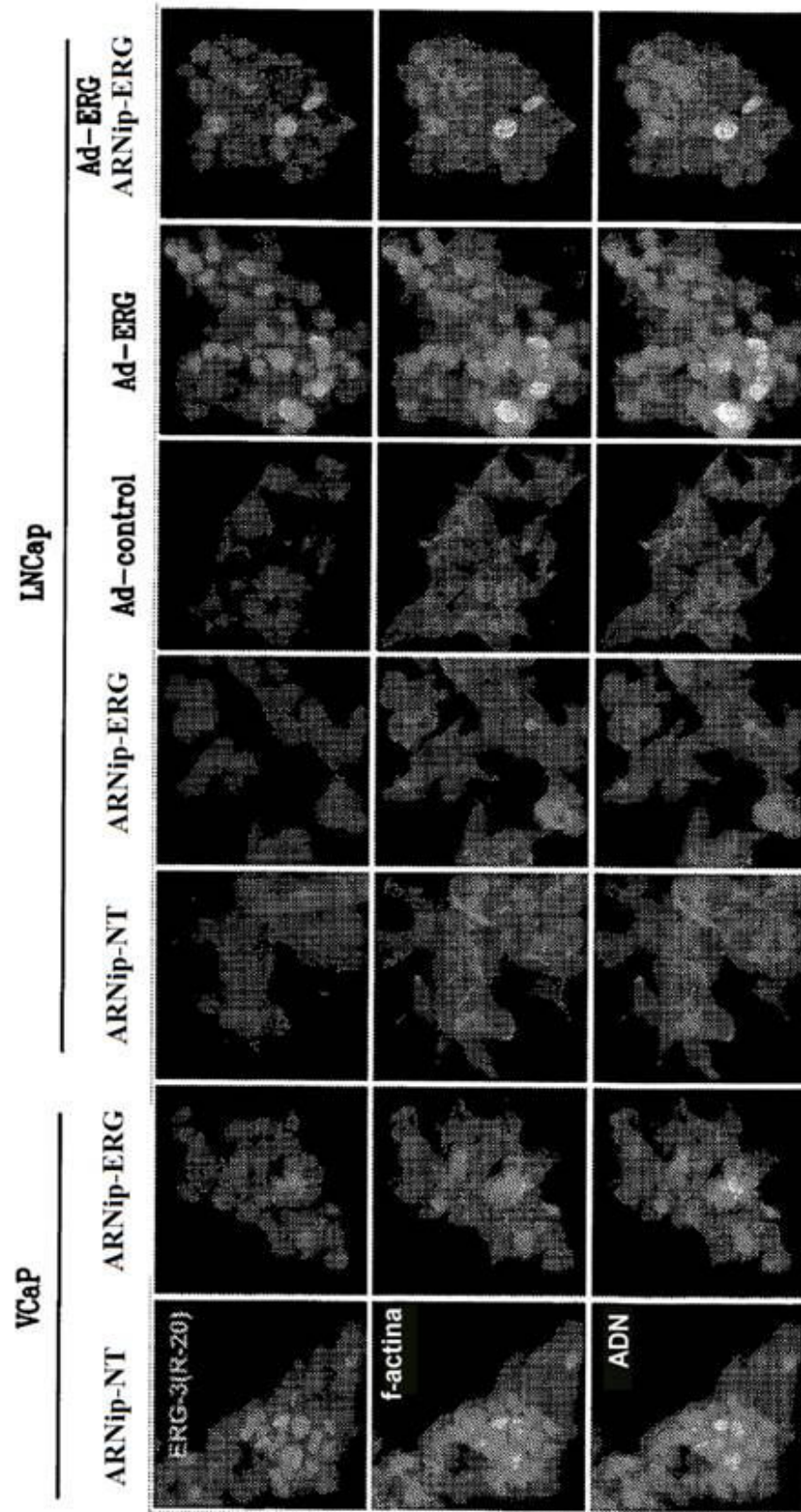
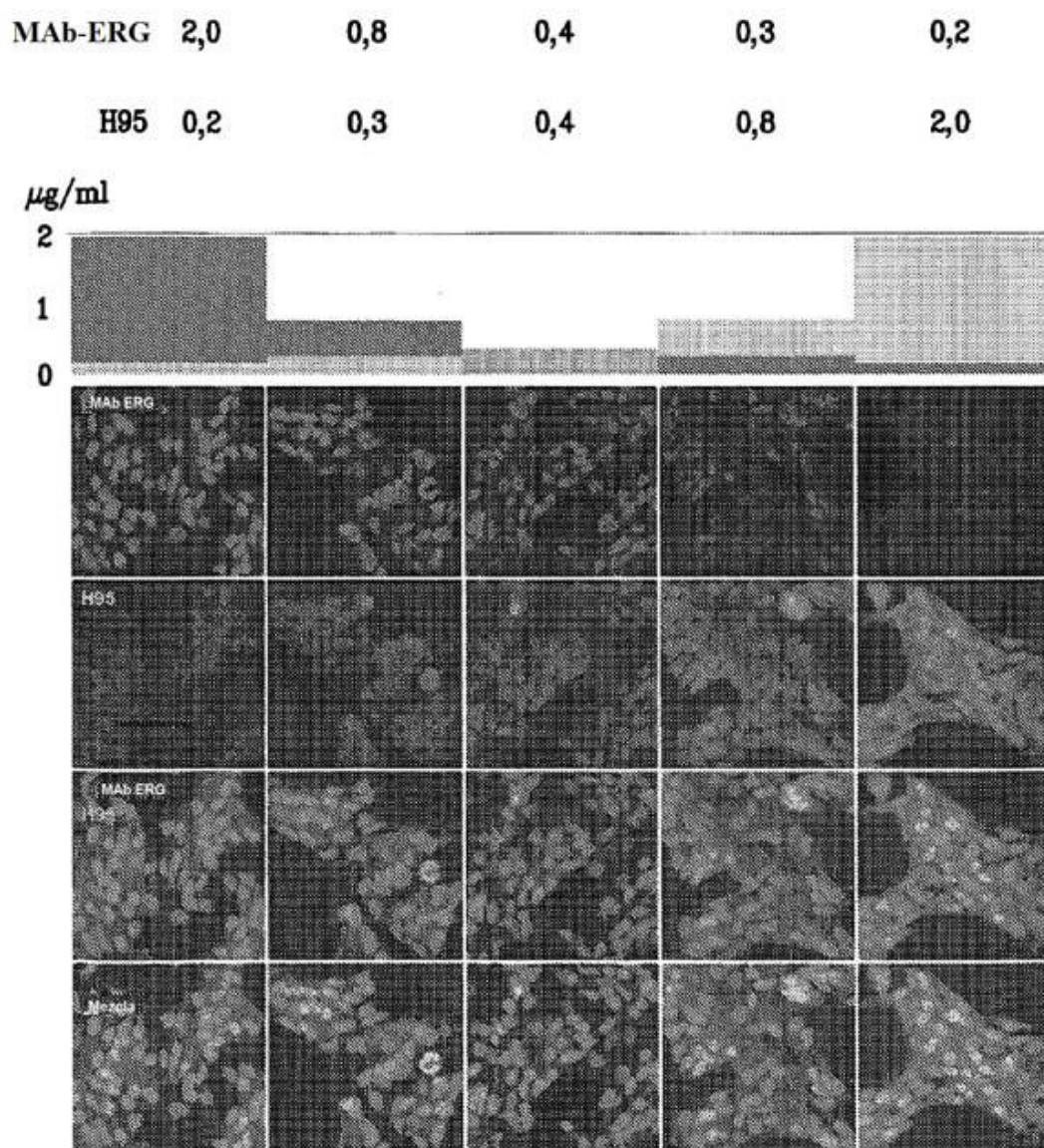


FIG. 12



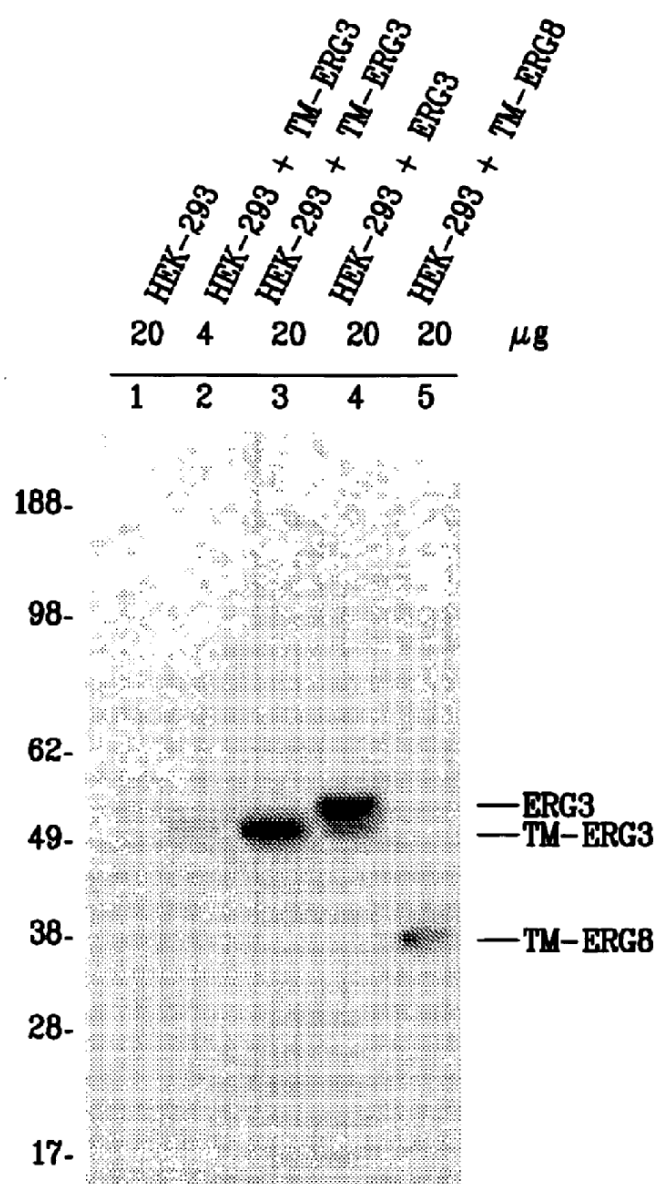


FIG. 13

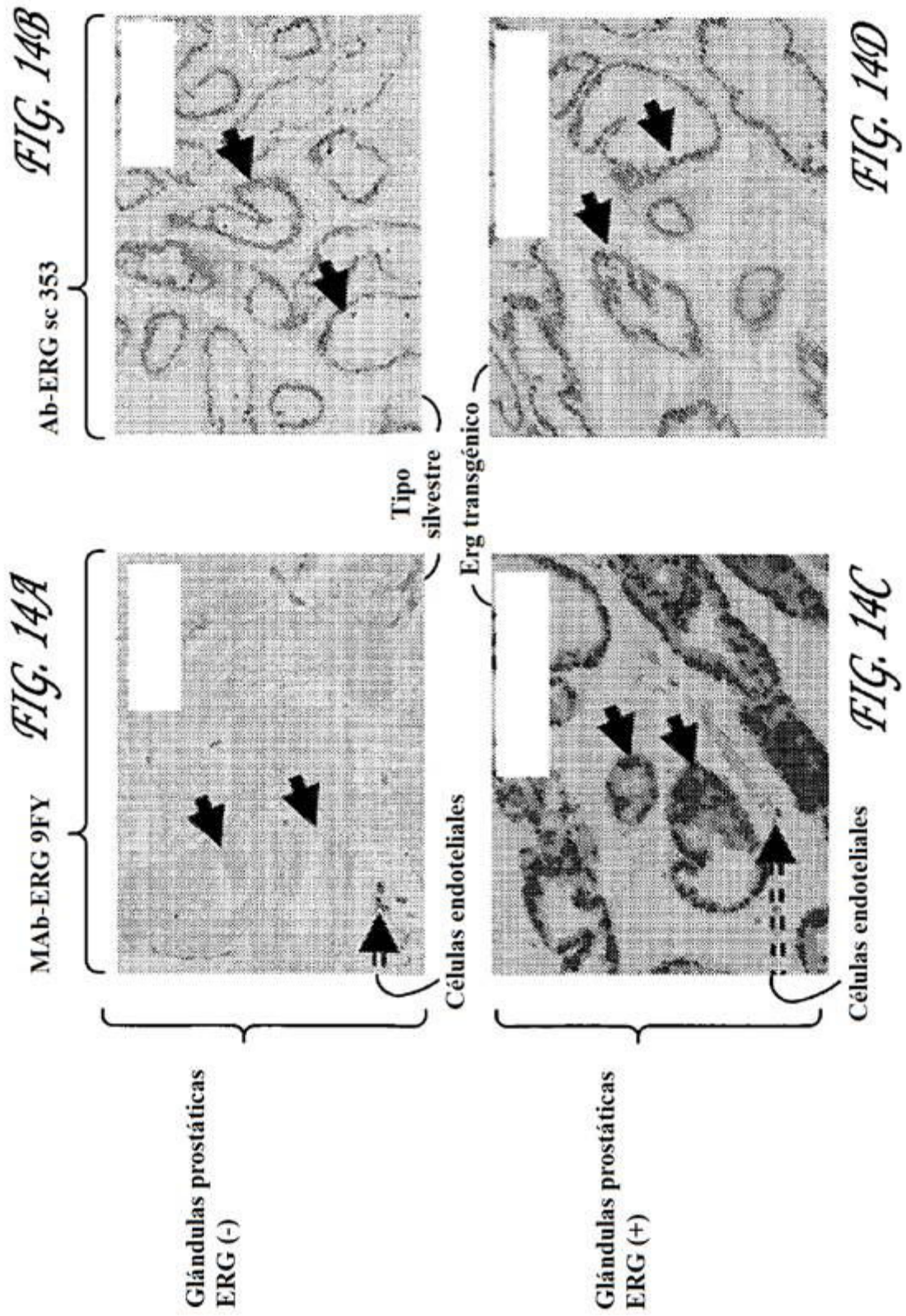


FIG. 15

