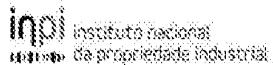

(11) Número de Publicação: **PT 1082341 E**



(51) Classificação Internacional:
C07K 14/00 (2009.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **1999.06.01**

(30) Prioridade(s): **1998.06.01 US 87598 P**
1998.06.29 US 91474 P
1999.04.14 US 129521 P

(43) Data de publicação do pedido: **2001.03.14**

(45) Data e BPI da concessão: **2010.12.08**
03/2011

(73) Titular(es):

AGENSYS, INC.
2225 COLORADO AVENUE SANTA MONICA CA
90404 **US**

(72) Inventor(es):

STEPHEN CHAPPELL MITCHELL **US**
ARTHUR B. RAITANO **US**
DOUGLAS C. SAFFRAN **US**
DANIEL E. AFAR **US**
RENE S. HUBERT **US**

(74) Mandatário:

MANUEL ANTÔNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA
AV LIBERDADE, Nº. 69 1250-148 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: ANTIGÉNIO DE TUMOR ÚTIL EM DIAGNÓSTICO E TERAPÊUTICA DE CANCRO DA PRÓSTATA E DO CÓLON

(57) Resumo:

DESCREVEM-SE COMPOSIÇÕES PARA O DIAGNÓSTICO E TERAPÊUTICA DE CANCRO DA PRÓSTATA E DO CÓLON, DERIVADO DE OU BASEADO NUMA NOVA PROTEASE DE SERINA DE SUPERFÍCIE CELULAR REGULADA POR ANDROGÉNIO E ESPECÍFICA DA PRÓSTATA DENOMINADA 20P1F12/TMPRSS2. PROPORCIONA-SE UM ADNC DE COMPRIMENTO COMPLETO QUE COMPREENDE A SEQUÊNCIA CODIFICANTE COMPLETA DO GENE DE 20P1F12/TMPRSS2 (TAMBÉM DESIGNADO 20P1F12-GTC1 NO PRESENTE DOCUMENTO) (FIG. 1). ENTRE AS COMPOSIÇÕES PROPORCIONADAS ESTÃO ANTICORPOS QUE SE LIGAM A PROTEÍNAS 20P1F12/TMPRSS2 E SEUS FRAGMENTOS POLIPEPTÍDICOS, QUE INCLUEM ANTICORPOS MARCADOS COM UM MARCADOR DETECTÁVEL OU TOXINA OU COMPOSIÇÃO TERAPÊUTICA. DESCREVEM-SE TAMBÉM DIVERSOS ANTICORPOS MONOCLONAIS ESPECIFICAMENTE REACTIVOS COM 20P1F12/TMPRSS2 NO PRESENTE DOCUMENTO.

RESUMO**"ANTIGÉNIO DE TUMOR ÚTIL EM DIAGNÓSTICO E TERAPÊUTICA DE
CANCRO DA PRÓSTATA E DO CÓLON"**

Descrevem-se composições para o diagnóstico e terapêutica de cancro da próstata e do cólon, derivado de ou baseado numa nova protease de serina de superfície celular regulada por androgénio e específica da próstata denominada 20P1F12/TMPRSS2. Proporciona-se um ADNC de comprimento completo que compreende a sequência codificante completa do gene de 20P1F12/TMPRSS2 (também designado 20P1F12-GTC1 no presente documento) (FIG. 1). Entre as composições proporcionadas estão anticorpos que se ligam a proteínas 20P1F12/TMPRSS2 e seus fragmentos polipeptídicos, que incluem anticorpos marcados com um marcador detectável ou toxina ou composição terapêutica. Descrevem-se também diversos anticorpos monoclonais especificamente reactivos com 20P1F12/TMPRSS2 no presente documento.

Descrição**"ANTIGÉNIO DE TUMOR ÚTIL EM DIAGNÓSTICO E TERAPÊUTICA DE
CANCRO DA PRÓSTATA E DO CÓLON"****ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

O cancro da próstata é o cancro mais frequentemente diagnosticado e segunda causa principal de morte por cancro em homens. Aproximadamente 45.000 homens morrem anualmente desta doença. Somente o cancro de pulmão tem uma mortalidade mais alta. A probabilidade de um homem desenvolver um cancro invasivo da próstata durante a sua vida é de 1 em 6. Aos 50 anos, um homem tem uma probabilidade superior a 40% de desenvolver o cancro da próstata e quase uma probabilidade de 3% de morrer desta doença. Enquanto alguns avanços foram alcançados no tratamento de tumores localmente confinados, o cancro da próstata é incurável após ter metastizado. Pacientes com cancro da próstata metastático são tratados com terapêutica de ablação hormonal, mas esta é somente bem-sucedida a curto prazo. Estes pacientes acabam por desenvolver um estado refractário a androgénio levando à progressão da doença e morte.

Um problema contínuo e fundamental na gestão de cancro da próstata é a ausência de marcadores de prognóstico e diagnóstico confiáveis capazes de detectar com precisão tumores localizados em fase inicial e/ou prever a progressão e susceptibilidade à doença. O diagnóstico e a detecção precoce de cancro da próstata actualmente dependem do exame rectal digital (DRE), medições de抗生剤 da próstata (PSA), ultrassonografia transrectal (TRUS), e biópsia transrectal por agulha (TRNB). Medições de PSA sérico em combinação com DRE representam a principal abordagem diagnóstica no momento. Contudo, esta abordagem tem grandes limitações as quais incitaram a pesquisa intensiva a encontrar melhores marcadores de diagnóstico

desta doença. Vários marcadores foram identificados, e pelo menos um, PSA, é de utilização clínica difundida. Contudo, marcadores de tumor de próstata ideais foram extremamente elusivos e nenhum marcador provou ainda ser confiável para prever a progressão da doença. Assim, existe uma necessidade de métodos de diagnóstico e prognóstico mais fiáveis e informativos na gestão de cancro da próstata.

Ademais, existe também um grande interesse em identificar proteínas específicas de próstata que poderiam ser apropriadas como alvos terapêuticos, já que não existe tratamento eficaz para pacientes que desenvolvem doença recorrente ou que foram diagnosticados com doença metastásica. Embora a terapêutica de ablação hormonal possa aliviar estes pacientes, a maioria inevitavelmente acaba por desenvolver doença independente de androgénio incurável (Lalani et al., 1997, *Cancer Metastasis Rev.* 16: 29-66).

O PSA é hoje o marcador de tumor mais amplamente utilizado para seleccionar, diagnosticar, e monitorizar o cancro da próstata. Em particular, diversos imunoensaios para a detecção de PSA sérico são de utilização clínica difundida. Recentemente, desenvolveu-se um ensaio de reacção em cadeia da polimerase-transcriptase reversa (RT-PCR) para ARNm de PSA em soro. Contudo, o PSA não é um marcador específico da doença, já que níveis elevados de PSA são detectáveis numa grande percentagem de pacientes com BPH e prostatite (25-86%) (Gao et al., 1997, *Prostate* 31: 264-281), bem como em outros transtornos não malignos e em alguns homens normais, um factor que significativamente limita a especificidade de diagnóstico deste marcador. Por exemplo, elevações em PSA sérico de entre 4 a 10 ng/ml são observados em BPH, e ainda valores mais altos são observados em prostatite, particularmente prostatite aguda. O BPH é uma patologia extremamente comum em homens. Confundindo mais a situação é o facto de que elevações de PSA sérico podem ser observadas sem qualquer indicação de

doença de DRE, e vice-versa. Além disso, é agora reconhecido que o PSA não é específico da próstata (Gao et al., *supra*, para revisão).

Descreveram-se vários métodos desenhados para melhorar a especificidade de detecção baseada em PSA, tais como medir a densidade de PSA e a razão de PSA livre versus complexado. Contudo, nenhuma destas metodologias foi capaz de distinguir de maneira reproduzível doença de próstata benigna de maligna. Ademais, os diagnósticos de PSA têm sensibilidades de entre 57-79% (Cupp & Osterling, 1993, Mayo Clin Proc 68:297-306), e assim perdem a identificação de cancro da próstata numa população significativa de homens com a doença.

Antigénio de Membrana Específico da Próstata (PSMA) é um marcador de superfície celular recentemente descrito de cancro da próstata que foi o assunto de vários estudos que avaliaram a sua utilização como um marcador diagnóstico e terapêutico. A expressão de PSMA está em grande parte restrinuida a tecidos da próstata, mas níveis detectáveis de ARNm de PSMA foram observados no cérebro, glândula salivar, intestino delgado, e carcinoma de célula renal (Israeli et al., 1993, Cancer Res 53: 227-230). A proteína de PSMA é altamente expressa na maioria dos cancros da próstata primários e metastáticos, mas é também expressa na maioria de espécimes de neoplasia intraepitelial (Gao et al., *supra*). Resultados preliminares utilizando um anticorpo monoclonal anti-PSMA marcado com índio-111, para visualizar cancro da próstata recorrente são promissores (Sodee et al., 1996, Clin Nuc Med 21: 759-766). O PSMA é um antigénio dependente de hormonas que requer a presença de receptor de androgénio funcional. Uma vez que nem todas as células de cancro da próstata expressam o receptor de androgénio, a utilidade clínica de PSMA como um alvo terapêutico pode ser inherentemente limitada. Ensaios

clínicos desenhados para examinar a efectividade de imunoterapêutica com PSMA estão também em curso.

Antigénio de Célula Estaminal de Próstata (PSCA) é outro marcador de superfície celular de cancro da próstata descrito muito recentemente (Reiter *et al.*, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 1735-1740). A expressão de PSCA mostrou ser específica da próstata e amplamente sobre-expressa através de todos os estágios de cancro da próstata, que inclui neoplasia intraepitelial prostática de alto grau (PIN), tumores de próstata dependentes de androgénio e independentes de androgénio. O gene de PSCA foi mapeado no cromossoma 8q24.2, uma região de ganho alélico em mais de 80% dos cancros da próstata. O PSCA é promissor como um alvo terapêutico e de diagnóstico em vista de sua localização de superfície celular, especificidade da próstata, e expressão muito regulada positivamente em células de cancro da próstata.

O progresso na identificação de marcadores específicos tem sido lento devido a uma falta de sistemas de modelo experimental animal que recapitulem a doença clínica. Tentativas de soluções a este problema incluíram a geração de linhas celulares de cancro da próstata (Horoszewicz *et al.*, 1983, Cancer Res. 43, 1809) e xenoenxertos de cancro da próstata (Pretlow *et al.*, 1991, Cancer Res. 51, 3814; van Weerden *et al.*, 1996, Am. J. Pathol. 149, 1055; Klein *et al.*, 1997, Nature Med. 3, 402). Contudo, estas abordagens depararam-se com um sucesso limitado. Por exemplo, xenoenxertos geralmente produziram baixas taxas de sobrevivência a longo prazo. Ademais, nenhuma das mais amplamente utilizadas linhas celulares de cancro da próstata humanas - PC-3, DU-145, e LNCaP - demonstraram de maneira reproduzível causar lesões osteoblásticas típicas de cancro da próstata. Uma limitação adicional das linhas celulares DU-145 e PC-3 é que estas células não expressam antigénio específico da próstata (PSA) ou receptor de

androgénio (AR) (Kaighn *et al.*, 1979, *Invest. Urol.* 17: 16-23; Gleave *et al.*, 1992, *Cancer Res.* 52: 1598-1605), o que questiona sua relevância para o cancro da próstata clínico. A linha celular de LNCaP é sensível a androgénio e expressa PSA, mas contém uma mutação no receptor de androgénio que altera a especificidade do ligando.

Recentemente, contudo, descreveu-se uma série de xenoenxertos de cancro da próstata (derivados de tumores de pacientes) que demonstram características genéticas e fenotípicas intimamente em paralelo com a situação clínica humana (Klein *et al.*, 1997, *Nature Med.* 3: 402). Estes xenoenxertos de LAPC (Cancro da Próstata de Los Angeles) sobreviveram a passagem em ratinhos com imunodeficiência combinada severa (SCID) durante mais de um ano. O sistema de modelo de xenoenxerto de LAPC-4 tem a capacidade de imitar a transição de dependência de androgénio a independência de androgénio (Klein *et al.*, 1997, *supra*). Os tumores de LAPC-4 regredem em ratinhos machos após a castração, mas crescem de novo dentro de 2-3 meses como tumores independentes de androgénio. Tanto tumores de xenoenxerto de LAPC-4 dependentes de androgénio (AD) como independentes de androgénio (AI) expressam níveis iguais dos marcadores específicos da próstata PSA, PSMA (antigénio de membrana específico da próstata) e PSCA (Antigénio de Célula Estaminal de Próstata), que foi identificado utilizando análise de diferença representacional de ADNc derivado das variantes AD e AI do xenoenxerto de LAPC-4.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a métodos e composições para o diagnóstico e terapêutica de cancro da próstata e do cólon, derivado de ou baseado numa nova protease de serina de superfície celular regulada por androgénio e específica da próstata denominada 20P1F12/TMPRSS2 e extensivamente descrita no presente documento. Proporciona-se um ADNc de

comprimento completo que comprehende a sequência codificante completa do gene de 20P1F12/TMPRSS2 (também designado 20P1F12-GTC1 no presente documento) (FIG. 1). Este ADNc codifica uma proteína que é altamente relacionada a, mas estruturalmente distinta de, o recentemente publicado TMPRSS2 (Paoloni-Giacobino et al., 1997 Genomics 44: 309-320). O gene de 20P1F12/TMPRSS2 também mostra um padrão de expressão muito diferente em relação ao perfil de expressão de TMPRSS2.

De acordo com um aspecto da presente invenção, proporciona-se uma proteína de 20P1F12/TMPRSS2 isolada que comprehende a sequência de aminoácidos mostrada na Fig. 1. Em outro aspecto da presente invenção, proporciona-se um polinucleótido isolado seleccionado de (a) um polinucleótido que tem a sequência de nucleótidos como mostrado na Fig. 1, em que T pode também ser U; (b) um polinucleótido que codifica um polipéptido 20P1F12/TMPRSS2 cuja sequência é codificada no ADNc contido no plasmídeo p20P1F12-GTC1 como depositado na American Type Culture Collection com n.º de acesso 207097; e (c) um polinucleótido que codifica a proteína d20P1F12/TMPRSS2 da FIG. 1.

Proporcionam-se também moléculas de ADN recombinantes que contêm os polinucleótidos de 20P1F12/TMPRSS2, células transformadas ou transduzidas com tais moléculas, e sistemas de hospedeiro-vector para a expressão de produtos de gene de 20P1F12/TMPRSS2.

Em outro aspecto, a presente invenção proporciona um ensaio para determinar a presença de cancro da próstata ou do cólon num indivíduo, que comprehende contactar uma amostra de teste de tecido da próstata ou do cólon com um anticorpo que se liga imunoespecificamente à proteína que consiste na sequência de aminoácidos da FIG. 1, e cujo anticorpo é marcado com um marcador detectável, e detectar a ligação da proteína de 20P1F12/TMPRSS2 na amostra ao

mesmo, em que um aumento significativo em expressão de proteína de 20P1F12/TMPRSS2 na amostra de tecido de teste em relação a níveis de expressão no correspondente tecido normal indica a presença de cancro da próstata ou do cólon.

Em outro aspecto, a invenção proporciona um ensaio para determinar a presença de cancro da próstata ou do cólon num indivíduo, que compreende:

- (a) colocar uma amostra de tecido da próstata ou do cólon em contacto com uma sonda de polinucleótido que especificamente hibridiza ao polinucleótido da Fig. 1; e
- (b) detectar a presença de um complexo de hibridação formado pela hibridação da sonda com polinucleótido de 20P1F12/TMPRSS2 na amostra, em que a presença do complexo de hibridação indica a presença de polinucleótido de 20P1F12/TMPRSS2 na amostra, em que um aumento significativo em polinucleótido de 20P1F12/TMPRSS2 na amostra em relação a níveis num correspondente tecido normal indica a presença de cancro.

Em outro aspecto, a invenção proporciona um ensaio para determinar a presença de cancro da próstata ou do cólon num indivíduo, que compreende:

- (a) produzir ADNc a partir de uma amostra de tecido da próstata ou do cólon por transcrição reversa utilizando pelo menos um iniciador;
 - (b) amplificar o ADNc assim produzido pela utilização de iniciadores *sense* e *anti-sense* para amplificar ADNc de 20P1F12/TMPRSS2 no mesmo; e
 - (c) detectar a presença do ADNc de 20P1F12/TMPRSS2 amplificado,
- em que os iniciadores *sense* e *anti-sense* são capazes de amplificar o polinucleótido da Fig. 1, e em que um aumento significativo em ADNc ou ARNm de 20P1F12/TMPRSS2 na amostra de tecido de teste em relação a níveis num correspondente tecido normal indica a presença de cancro da próstata ou do cólon.

A invenção também proporciona um anticorpo ou fragmento de ligação a抗igenio do mesmo que se liga imunoespecificamente à proteína que consiste na sequência de aminoácidos da Fig. 1, para utilização num método para o tratamento de cancro da próstata. Anticorpos que se ligam à proteína da FIG. 1 incluem anticorpos policlonais e monoclonais, anticorpos murinos e de outros mamíferos, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados e completamente humanos, e anticorpos marcados com um marcador detectável ou toxina ou composição terapêutica. Diversos anticorpos monoclonais especificamente reactivos com 20P1F12/TMPRSS2 são também descritos no presente documento. Estes e outros anticorpos de 20P1F12/TMPRSS2 são úteis em ensaios de diagnóstico molecular e métodos de diagnóstico por imagem para detectar, localizar e caracterizar carcinomas da próstata e do cólon e metástases dos mesmos.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

FIG. 1. Sequências de nucleótidos e aminoácidos deduzidos do clone de ADNc 20P1F12-GTC1 (Exemplo 3) (como depositado na ATCC; n.º de acesso 207097).

FIG. 2. Sequências de nucleótidos e aminoácidos deduzidos de sequência de gene de TMPRSS2 como publicado em Paoloni-Giacobino *et al.*, 1997, Genomics 44: 309-320.

FIG. 3. Alinhamento de sequência de aminoácidos que compara ADNc de 20P1F12-GTC1 (Exemplo 3) com a sequência de TMPRSS2 anteriormente publicada (Paoloni-Giacobino *et al.*, 1997, Genomics 44: 309-320). As diferenças de aminoácidos são mostradas em negrito.

FIG. 4. Sequência de nucleótidos de clone SSH 20P1F12 inicialmente isolado.

FIG. 5. Análise de RT-PCR de expressão de gene de 20P1F12/TMPRSS2 em xenoenxertos de cancro da próstata, próstata normal, e outros tecidos e linhas celulares, que

mostram níveis aproximadamente iguais de expressão em próstata normal e três xenoenxertos de cancro da próstata (Painel A); e que mostram expressão amplamente específica da próstata em tecidos humanos normais, com níveis de expressão detectáveis significativamente mais baixos em cólon, pâncreas, rim e pulmão (Painéis B e C).

FIG. 6. Análise de Northern blot de expressão de gene de 20P1F12/TMPRSS2 em tecidos humanos normais e xenoenxertos de cancro da próstata utilizando sonda de ADNc de clone 20P1F12 marcado. Painéis A e B: Expressão em 16 tecidos normais amplamente restritos a próstata; com rim, pâncreas e pulmão que mostram níveis de expressão 10 a 20 vezes mais baixos. Painel C: Expressão em Xenoenxertos de cancro da próstata de LAPC-4 e várias linhas celulares que mostram expressão de nível alto em xenoenxertos de cancro da próstata, algumas das linhas celulares de cancro da próstata, e numa linha celular de carcinoma de cólon. Excepto para LAPC-9 AI, a expressão de 20P1F12/TMPRSS2 nos xenoenxertos foi comparável a níveis observados em amostras de próstata normal. Ademais, expressão de nível mais baixo na linha de carcinoma epidermóide A431 foi observada.

FIG. 7. Expressão de 20P1F12/TMPRSS2 em linhas celulares de cancro da próstata e do cólon. Filtros de linha celular e xenoenxerto foram preparados com 10 µg de ARN total por pista. As manchas foram analisadas utilizando uma sonda de fragmento de gene derivado de 20P1F12/TMPRSS2. Todas as amostras de ARN foram normalizadas por coloração com brometo de etídio. Kilobases= kb.

FIG. 8. Caracterização de Anticorpos monoclonais direcionados contra 20P1F12/TMPRSS2. Anticorpos monoclonais contra a 20P1F12/TMPRSS2 foram gerados utilizando uma proteína de fusão de GST-20P1F12/TMPRSS2 purificada como descrito no Exemplo 5. Sobrenadantes de hibridoma foram inicialmente rastreados por ELISA contra proteína 20P1F12/TMPRSS2 purificada clivada a partir da

proteína de fusão-GST. Um rastreio secundário envolveu western blotting contra lisados derivados de células de 293T transfectadas com um vetor retroviral que codifica 20P1F12/TMPRSS2. (a) Seis mAbs (1 F9, 2D10, 2F8, 6B11, 8C6 e 9G8) que especificamente reconhecem 20P1F12/TMPRSS2 foram utilizados para sondar western blots de lisados celulares derivados de células de 293T transfectadas com ou 20P1F12/TMPRSS2 (pista 1) ou neo (como um controlo, pista 2). (B) Lisados celulares de células de 293T transfectadas com 20P1F12/TMPRSS2 (pista 1) ou neo (como um controlo, pista 2), LAPC-9 AD e LNCaP foram sondados com 1 F9 anti-TMPRSS2 mAb. Padrões de peso molecular são indicados no lado em kilodaltons (KD).

FIG. 9. Biotinilação de superfície celular de 20P1F12/TMPRSS2. (a) 20P1F12/TMPRSS2 com cauda de histidina ou neo (como um controlo) foram transfectadas em células de 293T. Células intactas foram incubadas com biotina para biotinilar todas as proteínas de superfície celular. Lisados celulares foram ou analisados por western blotting directamente (pistas 1 e 2, ou foram incubados com estreptavidina para purificar por afinidade todas as proteínas de superfície celular marcadas). Proteínas de superfície celular purificadas com estreptavidina foram analisadas por western blotting utilizando anticorpos anti-His (pistas 3 e 4). A proteína biotinilada foi detectada somente em células transfectadas 20P1F12/TMPRSS2. (B) (pista 2) e LNCaP (Pista 4) PC-3 biotinilados, e PC-3 (pista 1) e LNCaP (pista 3) não marcados foram incubados com gel de estreptavidina e então analisados por western blotting utilizando mAb 1F9. 20P1F12/TMPRSS2 foi detectado somente em amostras biotiniladas. Padrões de peso molecular são indicados no lado em kilodaltons (KD).

FIG. 10. Desglicosilação de 20P1F12/TMPRSS2 em células de 293T transfectadas. 20P1F12/TMPRSS2 com cauda de histidina transfectada em células de 293T foi purificada

utilizando Níquel-agarose. A proteína de 20P1F12/TMPRSS2 foi então desglicosilada utilizando N-glicosidase F. 20P1F12/TMPRSS2 (pista 1) não tratado e proteína desglicosilada (pista 2) foram analisados por western blotting utilizando anticorpos anti-His. Uma mudança em peso molecular é detectada com a desglicosilação. Padrões de peso molecular são indicados no lado em kilodaltons (KD).

FIG. 11. Regulação de androgénio de protease de superfície celular de 20P1F12/TMPRSS2. Células de LNCAP foram privadas de androgénio por crescer as células em soro fetal bovino pré-tratado com carvão activado a 2% durante 1 semana (pista 1), ou 24 horas (pista 3). A regulação de androgénio foi determinada estimulando células privadas durante 24 horas com 10 nM de mibolerona (análogo do androgénio) durante 9 horas (pista 4). A expressão de 20P1F12/TMPRSS2 foi comparada a níveis de 20P1F12/TMPRSS2 em células de LNCAP que crescem em meio completo (pista 2) por northern blotting de 10 µg de ARN/pista sondados com uma sonda de 20P1F12/TMPRSS2. A carga de ARN igual foi determinada por coloração com brometo de etídio e subsequente sondagem com uma sonda de β-actina. Os níveis de PSA foram determinados como um controlo para regulação de androgénio. Os padrões de peso molecular são indicados no lado em kilobases (kb).

FIG. 12. Regulação de androgénio de 20P1F12/TMPRSS2 em LNCaP. Células de LNCAP foram privadas de androgénio por crescer as células em soro fetal bovino pre'-tratadas com carvão activado a 2% durante 1 semana. A regulação de androgénio foi determinada estimulando células com mibolerona (Mib) por vários pontos de tempo. A expressão de 20P1F12/TMPRSS2 foi determinada por western blotting de lisados celulares utilizando anti-1 F9 mAb. Como controlos adicionais lisados celulares de células de PC-3 infectadas com ou neo (como um controlo) ou 20P1F12/TMPRSS2 foram

utilizados. A carga de proteína igual foi determinada pela sondagem do western blot com anticorpos anti-Grb-2 (Transduction Laboratories) (dados não mostrados). A expressão de proteína de 20P1F12/TMPRSS2 foi comparada com níveis de ARN por northern blotting de 10 µg de ARN/pista sondados com uma sonda de 20P1F12/TMPRSS2. A carga de ARN igual foi determinada pela sondagem do northern blot com uma sonda de β-actina.

FIG. 13. Efeito de expressão de 20P1F12/TMPRSS2 em Células de NIH 3T3. As células de NIH 3T3 foram infectadas com retrovírus que codifica ou neo (como um controlo) ou 20P1F12/TMPRSS2. Quarenta e oito horas após a infecção as células foram analisadas por meio de microscopia de luz. Células que pareciam acumular altos números de vacúolos são indicadas com flechas.

Descrição Detalhada da Invenção

A presente invenção refere-se a métodos e composições para o diagnóstico e terapêutica de cancro da próstata que utilizam polinucleótidos isolados correspondentes ao gene de 20P1F12/TMPRSS2, proteínas codificadas pelo gene de 20P1F12/TMPRSS2 e anticorpos capazes de especificamente reconhecer e ligar-se à proteína de 20P1F12/TMPRSS2s. O gene de 20P1F12/TMPRSS2 codifica uma proteína multimérica de 492 aminoácidos predita que contém um domínio de protease de serina, um domínio de receptor sequestrante rico em cisteína, um domínio de receptor LDL de classe A, e um domínio transmembranar predito como foi descrito para TMPRSS2 (Paoloni-Giacobino et al., 1997, Genomics 44: 309-320). Paoloni-Giacobino et al. descobriram que o gene de TMPRSS2 é expresso fortemente no intestino delgado e somente fracamente em diversos outros tecidos e também mapearam o gene de TMPRSS2 ao cromossoma 21. O papel fisiológico de TMPRSS2 é desconhecido. Os requerentes clonaram um ADNC de comprimento completo que compreende a região codificante inteira do gene de 20P1F12/TMPRSS2, mas

contém diversas diferenças de sequência de nucleótidos em relação à sequência publicada de TMPRSS2. Cinco destas diferenças de sequência resultaram em diferenças de aminoácidos. A natureza e o significado destas mudanças são desconhecidas no presente momento. Ademais, o novo 20P1F12/TMPRSS2 dos requerentes tem um padrão de expressão completamente diferente em comparação com o que conheceu-se do TMPRSS2 anteriormente reportado.

Por causa do 20P1F12/TMPRSS2 ser uma protease específica da próstata, é possível que funcione directamente no desenvolvimento e/ou progressão de cancro da próstata, particularmente no desenvolvimento de doença metastática. Em relação a isso, as proteases são conhecidas por estarem envolvidas em invasão e metástase de células de cancro (Henriet et al., 1999, APMIS 107(1):111-9; Rochefort et al., 1999, APMIS 107(1):86-95; Webber et al., 1995, Clin Cancer Res 1(10):1089-94; Duffy, 1996, Clin Cancer Res 2(4):613-8; Webber e Waghray, 1995 Clin Cancer Res 1(7):755-61). Por exemplo, pensa-se que o activador de plasminogénio tipo uroquinase (u-PA), catepsina D e PSA contribuem para a capacidade de células de cancro da próstata a metastatizar. O envolvimento directo potencial da função de 20P1F12/TMPRSS2 em cancro da próstata, e particularmente em metástase, pode ser avaliado como descrito no Exemplo 5.

De maneira interessante, a estrutura primária de 20P1F12/TMPRSS2 e TMPRSS2 contém domínios de interacção proteína-proteína e um domínio de protease extracelular. A função de 20P1F12/TMPRSS2 e TMPRSS2 não está clara. A função de 20P1F12/TMPRSS2 e TMPRSS2 pode envolver a ligação a proteínas de substrato no meio extracelular através de seus domínios SRCR e/ou LDLA. Os Exemplos de proteínas que exibem domínios SRCR incluem: CD6, uma molécula de adesão que se liga a ALCAM (molécula de adesão celular de leucócito activado) e media a ligação celular de epitélio

tímico-timócito (Whitney et al., 1995, J Biol Chem 270:18187); CD5 (Ly-1) uma proteína de célula T que liga CD72 em células B e pode estar envolvida em comunicação de célula T-B (Luo et al., 1992, J Immunol 148:1630); BSSP-3, uma protease de serina específica de cérebro com uma estrutura semelhante a kringle e três motivos de receptor sequestrante ricos em cisteína (Yamamura et al., 1997, Biochem Biophys Res Commun 239:386).

O domínio de protease de 20P1F12/TMPRSS2 é mais homólogo ao domínio de protease de hepsina (TMPRSS1), uma protease de serina transmembranar que é altamente expressa em fígado e regulada positivamente em cancro de ovários (Leyus et al., 1988, Biochemistry 27: 1067-74; Tanimoto et al., 1997, Cancer Res. 57: 2884-2887).

A invenção baseia-se, em parte, no isolamento de um fragmento de ADNc correspondente ao gene de 20P1F12/TMPRSS2 por clonagem de Hibridação Subtrativa de Supressão e mediante estudos detalhados de caracterização molecular e bioquímica descritos nos Exemplos. O fragmento de ADNc inicialmente isolado, clone 20P1F12, mostrou identidade numa parte sobreposta da sequência não traduzida 3' do ADNc de comprimento completo recentemente descrito que codifica TMPRSS2. Iniciadores desenhados para especificamente amplificar o gene correspondente a 20P1F12 foram então utilizados para caracterizar a expressão de 20P1F12/TMPRSS2 em xenoenxertos de cancro da próstata, próstata normal, e uma variedade de outros tecidos normais. Um ADNc de comprimento completo que comprehende a sequência codificante completa do gene de 20P1F12/TMPRSS2 foi isolado e sequenciado e é proporcionado no presente documento.

As sequências de nucleótidos e aminoácidos deduzidos do novo gene de 20P1F12/TMPRSS2 (também designado 20P1F12-GTC1 no presente documento) são mostradas na Fig. 1. Existem diferenças significativas nas sequências de aminoácidos codificadas pelo gene de 20P1F12-GTC1/TMPRSS2

em comparação com a sequência de TMPRSS2 anteriormente reportada (veja-se o alinhamento de aminoácidos na Fig. 3). Por exemplo, quatro das diferenças de aminoácidos são no domínio de protease, três dos quais são diferenças de aminoácidos não conservadoras e que poderiam afectar função e/ou especificidade da protease. A nova proteína de 20P1F12/TMPRSS2 dos requerentes foi extensivamente caracterizada, como descrito adicionalmente nas secções de Exemplos no presente documento. A proteína de 20P1F12/TMPRSS2 é uma proteína transmembranar glicosilada de tipo II com um domínio de protease C-terminal extracelular. O gene de 20P1F12/TMPRSS2 é regulado por androgénio. A proteína de 20P1F12/TMPRSS2 é expressa na superfície celular. A expressão do gene de 20P1F12/TMPRSS2 em tecidos normais é específica da próstata. A expressão de 20P1F12/TMPRSS2 é também observada em cancro da próstata, que inclui a expressão de nível alto em doença avançada e metastática. Ademais, 20P1F12 parece ser sobre-expressa em cancro do cólon e pode também ser expressa em outros cancros.

Ademais das diferenças em estrutura entre o gene de 20P1F12-GTC1/TMPRSS2 (FIG. 1) dos requerentes e a sequência anteriormente reportada (FIG. 2), os resultados da análise de expressão dos requerentes são contrários aos reportados por Paoloni-Giacobino *et al.* Em particular, a análise dos requerentes de expressão de gene de 20P1F12/TMPRSS2 por RT-PCR em 16 tecidos normais mostra a expressão de nível mais alto em próstata, com substancialmente níveis mais baixos detectados em cólon, pâncreas, rim, fígado e pulmão e expressão não detectável em intestino delgado (FIG. 5, Painéis B e C). Resultados similares foram obtidos em análise de Northern blot, embora o nível de expressão detectado em próstata por northern blot seja extremamente alto em relação a estes outros tecidos em que somente

expressão de nível muito baixo é detectado (FIG. 6, Painéis A e B).

A análise de expressão também mostra a expressão de nível alto de 20P1F12/TMPRSS2 em todos os xenoenxertos de cancro da próstata testados, em aproximadamente os mesmos níveis vistos em próstata normal (FIG. 5, Painel A). A análise de Northern blot mostra resultados similares, com alguma expressão de nível mais baixo detectada no xenoenxerto de LAPC-9 em relação aos xenoenxertos de LAPC-4 e próstata normal; expressão é também detectada em algumas das linhas celulares de cancro da próstata analisadas (FIG. 6, Painel C). O gene de 20P1F12/TMPRSS2 é também expresso num número de linhas celulares de cancro da próstata (FIG. 7). Estes resultados indicam que o gene de 20P1F12/TMPRSS2 é primariamente um gene específico da próstata que pode estar envolvido no desenvolvimento e/ou progressão de cancro da próstata. Ademais, expressão de nível alto de 20P1F12/TMPRSS2 foi detectada por northern blot num número de linhas celulares de carcinoma de cólon (FIG. 6, Painel C; FIG. 7). A expressão de 20P1F12/TMPRSS2 em cancro do cólon pode proporcionar uma base molecular para detectar, diagnosticar, prognosticar e/ou tratar cancro do cólon.

Assim, a invenção proporciona um único e útil gene de 20P1F12/TMPRSS2 (e proteína), que tem o nucleótido e sequências de aminoácidos codificadas como mostrado na Fig. 1. Sondas de nucleótido correspondente ao todo ou parte das sequências de ADNc de 20P1F12/TMPRSS2 revelados no presente documento (FIGS. 1 e 4) são proporcionadas e podem ser utilizadas para isolar ou identificar outros ADNc que codificam todo ou parte da sequência de gene de 20P1F12/TMPRSS2. A invenção proporcionou adicionalmente iniciadores capazes de especificamente amplificar o gene de 20P1F12/TMPRSS2 ou seus transcriptos de ARN. A invenção proporciona adicionalmente polinucleótidos isolados que contém sequências codificantes de produto(s) do gene de

20P1F12/TMPRSS2. Tais polinucleótidos podem ser utilizados para expressar péptidos e proteínas codificadas por 20P1F12/TMPRSS2 que tem um número de utilizações adicionais. Os iniciadores e sondas de gene de 20P1F12/TMPRSS2 podem também ser utilizados para detectar a presença ou ausência de ARNm de 20P1F12/TMPRSS2 em várias amostras biológicas, para detectar células de cancro da próstata e outras células que expressam 20P1F12/TMPRSS2, para gerar vacinas de tumor, e em ensaios de prognóstico e diagnóstico molecular para cancro da próstata. Polinucleótidos correspondentes ou complementares ao gene de 20P1F12/TMPRSS2 podem ser úteis em métodos para tratar cancro da próstata, tais como, por exemplo, em modular ou inibir actividade biológica de 20P1F12/TMPRSS2.

Mais especificamente, um polinucleótido de 20P1F12/TMPRSS2 útil na prática da invenção pode compreender um polinucleótido que tem a sequência de nucleótidos de 20P1F12/TMPRSS2 humano como mostrado na Fig. 1 (SEQ ID NO. XX) ou a sequência de nucleótidos do TMPRSS2 anteriormente reportado como mostrado na Fig. 2 (SEQ ID NO: XX), uma sequência complementar a ou do anterior, ou um fragmento de polinucleótido de qualquer do anterior. Outra concretização compreende um polinucleótido que codifica a sequência de aminoácidos da proteína de 20P1F12/TMPRSS2 como mostrado na Fig. 1 (SEQ ID NO. XX).

Incluem-se dentro do âmbito deste aspecto da invenção estão ADN genômico, ADNc, ribozimas, e moléculas anti-sense, bem como moléculas de ácido nucleico baseadas numa cadeia principal alternativa ou que incluem bases alternativas, se derivados de fontes naturais ou sintetizados. Por exemplo, moléculas anti-sense podem ser ARN ou outras moléculas, que incluem ácidos peptídicos nucleicos (PNA) ou moléculas não de ácido nucleico tais como derivados de fosforotioato, que se liga especificamente a ADN ou ARN numa maneira dependente de

pares de base. Um perito na especialidade pode prontamente obter estas classes de moléculas de ácido nucleico utilizando os polinucleótidos de 20P1F12/TMPRSS2 e sequências de polinucleótido descritas no presente documento.

Concretizações específicas adicionais deste aspecto da invenção incluem a utilização de iniciadores e pares de iniciadores, que permitem a amplificação específica dos polinucleótidos da invenção ou de quaisquer partes específicas do mesmo, e sondas que selectivamente ou especificamente hibridizam a moléculas de ácido nucleico da invenção ou a qualquer parte do mesmo. As sondas podem ser marcadas com um marcador detectável, tais como, por exemplo, um radioisótopo, composto fluorescente, composto bioluminescente, um composto quimioluminescente, quelante de metal ou enzima. Tais sondas e iniciadores podem ser utilizados para detectar a presença de um polinucleótido de 20P1F12/TMPRSS2 numa amostra e como um meio para detectar uma célula que expressa uma proteína de 20P1F12/TMPRSS2. Um exemplo de tal sonda é um polipeptídeo que compreende toda ou parte da sequência de ADNC 20P1F12/TMPRSS2 humana mostrada na Fig. 1 (SEQ ID NO. XX). Os Exemplos de pares de iniciadores capazes de especificamente amplificar ARNm de 20P1F12/TMPRSS2 são também descritos nos Exemplos que seguem. Como será entendido pelo perito na especialidade, iniciadores e sondas bem diferentes podem ser preparados baseados nas sequências proporcionadas no presente documento e utilizadas efectivamente para amplificar e/ou detectar um ARNm de 20P1F12/TMPRSS2.

Os polinucleótidos de 20P1F12/TMPRSS2 da invenção são úteis para uma variedade de propósitos, que incluem, mas não estão limitados a sua utilização como sondas e iniciadores para a amplificação e/ou detecção do gene de 20P1F12/TMPRSS2, ARNm, ou fragmentos do mesmo; como reagentes para o diagnóstico e/ou prognóstico de cancro da

próstata e do cólon; como sequências codificantes capazes de direcionar a expressão de polipéptidos de 20P1F12/TMPRSS2; como ferramentas para modular ou inibir a expressão do gene de 20P1F12/TMPRSS2 e/ou tradução do transcripto de 20P1F12/TMPRSS2; e como agentes terapêuticos.

A invenção também proporciona polipéptidos e proteínas de 20P1 F12/TMPRSS2 que podem ser utilizados, por exemplo, para gerar anticorpos ou para utilização como vacinas contra o cancro. Os anticorpos capazes de especificamente ligar-se a e identificar polipéptidos ou proteínas de 20P1F12/TMPRSS2 podem ser utilizados para detectar a expressão de 20P1 F12/TMPRSS2, determinar sua localização subcelular, detectar e formar imagem de células de cancro da próstata e tumores da próstata, e modular ou inibir a actividade biológica de 20P1F12/TMPRSS2. Os anticorpos podem também ser utilizados terapeuticamente como descrito adicionalmente a seguir. Os métodos para a geração de anticorpos policlonais e monoclonais são bem conhecidos na técnica.

A invenção também proporciona moléculas de ADN ou ARN recombinantes que contém um polinucleótido de 20P1F12/TMPRSS2, que incluem, mas não estão limitados a fagos, plasmídeos, fagomídeos, cosmídeos, YACs, BACs, bem como vários vectores virais e não virais bem conhecidos na técnica, e células transformadas ou transfectadas com tais moléculas de ADN ou ARN recombinantes. Como utilizado no presente documento, uma molécula de ADN ou ARN recombinante é uma molécula de ADN ou ARN que foi submetida a manipulação molecular *in vitro*. Os métodos para gerar tais moléculas são bem conhecidos (veja-se, por exemplo, Sambrook *et al*, 1989, *supra*).

A invenção ainda proporciona um sistema hospedeiro-vector que compreende uma molécula de ADN recombinante que contém um polinucleótido de 20P1F12/TMPRSS2 dentro de uma

célula hospedeira procariótica ou eucariótica adequada. Os exemplos de células hospedeiras eucarióticas adequadas incluem uma célula de levedura, uma célula de planta, ou uma célula animal, tal como uma célula de mamífero ou uma célula de insecto (por exemplo, uma célula infectável por baculovírus tal como uma célula Sf9). Os exemplos de células de mamífero adequadas incluem várias linhas celulares de cancro da próstata tais como LnCaP, PC-3, DU145, LAPC-4, TsuPr1, outras linhas celulares transfectáveis ou transduzíveis de cancro da próstata, bem como um número de células de mamífero rotineiramente utilizado para a expressão de proteínas recombinantes (por exemplo, células de COS, CHO, 293, 293T). Mais particularmente, um polinucleótido que compreende a sequência codificante de um 20P1F12/TMPRSS2 pode ser utilizada para gerar proteínas de 20P1F12/TMPRSS2 ou fragmentos do mesmo utilizando qualquer número de sistemas de hospedeiro-vector rotineiramente utilizados e amplamente conhecidos na técnica.

Uma faixa ampla de sistemas de hospedeiro-vector adequados para a expressão de proteína de 20P1F12/TMPRSS2s ou fragmentos do mesmo estão disponíveis, veja-se por exemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*; Current Protocols in Molecular Biology, 1995, *supra*). Vectores preferidos para expressão em mamíferos incluem, mas não estão limitados a pADNC 3.1 myc-His-tag (Invitrogen) e o vector retroviral pSRøtkneo (Muller *et al.*, 1991, MCB 11:1785). Utilizando estes vectores de expressão, 20P1F12/TMPRSS2 pode ser preferentemente expressado em diversas linhas celulares de cancro da próstata ou não da próstata, que incluem por exemplo 3T3, 293, 293TPC-3, LnCaP e TsuPr1. Os sistemas de hospedeiro-vector da invenção são úteis para a produção de uma proteína de 20P1 F12/TMPRSS2 ou fragmento do mesmo. Tais sistemas de hospedeiro-vector podem ser empregados

para estudar as propriedades funcionais de 20P1F12/TMPRSS2 e mutações de 20P1F12/TMPRSS2.

As proteínas codificadas pelos genes de 20P1F12/TMPRSS2, ou por fragmentos do mesmo, terão uma variedade de utilizações, que incluem, mas não estão limitados a gerar anticorpos e em métodos para identificar ligandos e outros agentes e constituintes celulares que se ligam a um produto de gene de 20P1F12/TMPRSS2. Tais proteínas podem também ser utilizadas como vacinas contra o cancro. Os anticorpos levantados contra uma proteína de 20P1F12/TMPRSS2 ou fragmento do mesmo podem ser úteis em ensaios de diagnóstico e prognóstico, metodologias de formação de imagem (que incluem, particularmente, formação de imagem de cancro), e métodos terapêuticos na gestão de cancros humanos caracterizados pela expressão de uma proteína de 20P1F12/TMPRSS2, tais como cancros da próstata e do cólon. Vários ensaios imunológicos úteis para a detecção de proteínas de 20P1F12/TMPRSS2 estão contemplados, que incluem, mas não estão limitados a vários tipos de radioimunoensaios, ensaios imunoabsorventes ligados a enzima (ELISA), ensaios imunofluorescentes ligados a enzima (ELIFA), métodos imunocitoquímicos, e similares. Tais anticorpos podem ser marcados e utilizados como reagentes de formação de imagem imunológicos capazes de detectar células da próstata (por exemplo, em métodos de formação de imagem radiocintigráficos).

Numa concretização específica, uma nova proteína de 20P1F12/TMPRSS2 que tem a sequência de aminoácidos de 20P1F12/TMPRSS2 humano é proporcionada na Fig. 1 (SEQ ID NO. XX). As proteínas de fusão que combinam todo ou parte de 20P1F12/TMPRSS2 com um polipeptídeo heterólogo estão também contemplados. A proteína de 20P1F12/TMPRSS2 da invenção pode ser concretizada de muitas formas, preferentemente de forma isolada. Como utilizado no presente documento, a proteína é dita "isolada" quando

métodos físicos, mecânicos ou químicos são empregados para retirar a proteína de 20P1F12/TMPRSS2 de constituintes celulares que são normalmente associados à proteína. Um perito na especialidade pode prontamente empregar métodos de purificação padrão para obter uma proteína de 20P1F12/TMPRSS2 isolada. Uma molécula de proteína de 20P1F12/TMPRSS2 purificada será substancialmente livre de outras proteínas ou moléculas que prejudicam a ligação de 20P1F12/TMPRSS2 ao anticorpo ou outro ligando. A natureza e grau de isolamento e purificação dependerão da utilização pretendida. Concretizações de uma proteína de 20P1F12/TMPRSS2 incluem uma proteína de 20P1F12/TMPRSS2 purificada e uma proteína de 20P1F12/TMPRSS2 solúvel e funcional. Numa forma, tais proteínas de 20P1F12/TMPRSS2 solúveis e funcionais ou fragmentos do mesmo retêm a capacidade de ligar-se a anticorpo ou outro ligando.

Métodos recombinantes podem ser utilizados para gerar moléculas de ácido nucleico que codificam a proteína de 20P1F12/TMPRSS2. Em relação a isso, as moléculas de ácido nucleico que codificam 20P1F12/TMPRSS2 descritas no presente documento proporcionam meios para gerar fragmentos definidos da proteína de 20P1F12/TMPRSS2. Tais polipéptidos de 20P1F12/TMPRSS2 são particularmente úteis em gerar anticorpos específicos de domínio (por exemplo, anticorpos que reconhecem um epítopo extracelular da proteína de 20P1F12/TMPRSS2), identificar agentes ou factores celulares que se ligam a um particular domínio de 20P1F12/TMPRSS2, e em vários contextos terapêuticos, que incluem, mas não estão limitados a vacinas contra o cancro. Os polipéptidos de 20P1F12/TMPRSS2 que contém particularmente estruturas interessantes podem ser preditas e/ou identificadas utilizando várias técnicas analíticas bem conhecidas na técnica, que incluem, por exemplo, os métodos de Chou-Fasman, Garnier-Robson, Kyte-Doolittle, Eisenberg, Karplus-

Schultz ou Análise de Jameson-Wolf, ou com base na imunogenicidade.

Também descritos no presente documento são anticorpos que se ligam imunoespecificamente à proteína de 20P1F12/TMPRSS2 e fragmentos de polipeptído do mesmo. Os anticorpos mais preferidos serão ligados selectivamente a uma proteína de 20P1F12/TMPRSS2 e não serão ligados (ou serão ligados fracamente) a polipeptídos e proteínas não de 20P1F12/TMPRSS2. Anticorpos anti-20P1F12/TMPRSS2 que são particularmente contemplados incluem anticorpos monoclonais e policlonais bem como fragmentos que contém o domínio de ligação a antigénio e/ou uma ou mais regiões de determinação de complementaridade destes anticorpos. Como utilizado no presente documento, um fragmento de antícorpo é definido como pelo menos uma porção da região variável da molécula de imunoglobulina que se liga ao seu alvo, isto é, a região de ligação a antigénio.

Para algumas aplicações, pode ser desejável gerar anticorpos que especificamente reagem com uma proteína de 20P1F12/TMPRSS2 e/ou um epítopo particular dentro de um domínio estrutural particular. Por exemplo, anticorpos preferidos úteis para propósitos de diagnóstico de cancro por imagem são aqueles que reagem com um epítopo numa região extracelular da proteína de 20P1F12/TMPRSS2 como expressado em células de cancro. Tais anticorpos podem ser gerados pela utilização da proteína de 20P1F12/TMPRSS2, ou utilizando péptidos derivados de extracelulares preditos ou outros domínios de 20P1F12/TMPRSS2, e utilizados como um imunogénio.

Os anticorpos de 20P1F12/TMPRSS2 descritos no presente documento podem ser particularmente úteis em ensaios de diagnóstico e prognóstico de cancro da próstata e do cólon, metodologias de formação de imagem e estratégias terapêuticas. A invenção proporciona vários ensaios imunológicos úteis para a detecção e quantificação de

20P1F12/TMPRSS2. Tais ensaios geralmente compreendem um ou mais anticorpos de 20P1F12/TMPRSS2 capazes de reconhecer e ligar-se a um 20P1F12/TMPRSS2, e podem ser realizados dentro de vários formatos de ensaio imunológicos bem conhecidos na técnica, que incluem, mas não estão limitados a vários tipos de radioimunoensaios, ensaios imunoabsorventes ligados a enzima (ELISA), ensaios imunofluorescentes ligados a enzima (ELIFA) e similares. Ademais, métodos imunológicos por imagem capazes de detectar cancro da próstata são também proporcionados pela invenção, que incluem, mas não estão limitados a métodos de formação de imagem radiocintigráficos utilizando anticorpos marcados de 20P1F12/TMPRSS2. Tais ensaios podem ser clinicamente úteis na detecção, monitorização e prognóstico de cancro da próstata, particularmente cancro da próstata avançado.

Os anticorpos de 20P1F12/TMPRSS2 podem também ser utilizados em métodos para purificar proteínas e polipeptídos de 20P1F12/TMPRSS2 e para isolar homólogos de 20P1F12/TMPRSS2 e moléculas relacionadas. Por exemplo, numa concretização, o método de purificação de uma proteína de 20P1F12/TMPRSS2 compreende incubar um antícorpo de 20P1F12/TMPRSS2, que foi acoplado a uma matriz sólida, com um lisado ou outra solução que contém 20P1F12/TMPRSS2 sob condições que permitem que o antícorpo de 20P1F12/TMPRSS2 se ligue a 20P1F12/TMPRSS2; lavar a matriz sólida para eliminar impurezas; e eluir o 20P1F12/TMPRSS2 do antícorpo acoplado. Outras utilizações dos anticorpos de 20P1F12/TMPRSS2 descritos no presente documento incluem gerar anticorpos anti-idiotípicos que imitam a proteína de 20P1F12/TMPRSS2.

Os anticorpos de 20P1F12/TMPRSS2 podem também ser utilizados terapeuticamente por, por exemplo, modulação ou inibição da actividade biológica de uma proteína de 20P1F12/TMPRSS2 ou objectivação e destruição de células de

cancro da próstata que expressam uma proteína de 20P1F12/TMPRSS2. Descreve-se a terapêutica de anticorpos de cancro da próstata e do cólon em mais detalhe abaixo.

Vários métodos para a preparação de anticorpos são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, os anticorpos podem ser preparados por imunização de um hospedeiro mamífero adequado utilizando uma proteína, péptido, ou fragmento de 20P1F12/TMPRSS2, em forma isolada ou imunoconjugada (*Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press, Eds., Harlow, e Lane (1988); Harlow, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Press, NI (1989)). Ademais, as proteínas de fusão de 20P1F12/TMPRSS2 podem também ser utilizadas, tais como uma proteína de fusão de GST de 20P1F12/TMPRSS2. Numa concretização particular, uma proteína de fusão de GST que compreende toda ou a maioria da sequência de aminoácidos da grelha de leitura aberta da FIG. 1 pode ser produzida e utilizada como um imunogénio para gerar anticorpos apropriados. Como descrito no Exemplo 5, tal fusão de GST foi utilizada para gerar diversos anticorpos monoclonais que immunoespecificamente reagem com 20P1F12/TMPRSS2. As células que expressam ou que sobre-expressam 20P1F12/TMPRSS2 podem também ser utilizadas para imunizações. De maneira similar, qualquer célula construída para expressar 20P1F12/TMPRSS2 pode ser utilizada. Esta estratégia pode resultar na produção de anticorpos monoclonais com capacidades aumentadas para reconhecer 20P1F12/TMPRSS2 endógeno. Estratégias adicionais para gerar anticorpos de 20P1F12/TMPRSS2 são descritas no Exemplo 5 no presente documento.

A sequência de aminoácidos de 20P1F12/TMPRSS2 como mostrado na Fig. 1 (SEQ ID NO. XX) pode ser utilizada para seleccionar regiões específicas da proteína de 20P1F12/TMPRSS2 para gerar anticorpos. Por exemplo, análises de hidrofobicidade e hidrofilicidade da sequência de aminoácidos de 20P1 F12/TMPRSS2 podem ser utilizadas

para identificar regiões hidrofílicas na estrutura de 20P1F12/TMPRSS2. Regiões da proteína de 20P1F12/TMPRSS2 que mostram estrutura imunogénica, bem como outras regiões e domínios, podem prontamente ser identificadas utilizando vários outros métodos conhecidos na técnica, tais como Chou-Fasman, Garnier-Robson, Kyte-Doolittle, Eisenberg, Karplus-Schultz ou análise de Jameson-Wolf.

Os métodos para preparar uma proteína ou polipéptido para utilização como um imunogénio e para preparar conjugados imunogénicos de uma proteína com um transportador tal como BSA, KLH, ou outras proteínas transportadoras são bem conhecidas na técnica. Em algumas circunstâncias, a conjugação directa utilizando, por exemplo, reagentes de carbodiimida pode ser utilizada; em outros exemplos reagentes de ligação tais como aqueles fornecidos por Pierce Chemical Co., Rockford, IL, podem ser efectivos. A administração de um imunogénio de 20P1F12/TMPRSS2 é conduzida geralmente por injecção ao longo de um período de tempo adequado e com utilização de um adjuvante adequado, como é geralmente entendido na técnica. Durante o calendário de imunização, títulos de anticorpos podem ser tomados para determinar a adequação da formação de anticorpos.

Os anticorpos monoclonais anti-20P1F12/TMPRSS2 são preferidos e podem ser produzidos por vários meios bem conhecidos na técnica. Por exemplo, as linhas celulares imortalizadas que secretam um anticorpo monoclonal desejado podem ser preparadas utilizando o método padrão de Kohler e Milstein ou modificações que efectuam a imortalização de linfócitos ou células do baço, como é geralmente conhecido. As linhas celulares imortalizadas que secretam os anticorpos desejados são seleccionadas por imunoensaio em que o antigénio é a proteína de 20P1F12/TMPRSS2 ou fragmento de 20P1F12/TMPRSS2. Quando a apropriada cultura de células imortalizadas que secretam o anticorpo desejado

é identificada, as células podem ser expandidas e os anticorpos produzidos ou de culturas *in vitro* ou de fluido de ascite.

Os anticorpos ou fragmentos podem também ser produzidos, utilizando a tecnologia actual, por meios recombinantes. As regiões que se ligam especificamente às regiões desejadas da proteína de 20P1F12/TMPRSS2 podem também ser produzidas no contexto de anticorpos enxertados de CDR ou quiméricos de múltiplas origens de espécies. Anticorpos humanos ou humanizados de 20P1F12/TMPRSS2 podem também ser produzidos e são preferidos. Várias abordagens para produzir tais anticorpos humanizados são conhecidos, e incluem métodos de enxerto de CDR ou quiméricos; métodos para produzir anticorpos monoclonais completamente humanos incluem métodos de *phage display* e transgénicos (para revisão, veja-se Vaughan et al., 1998, *Nature Biotechnology* 16: 535-539).

Anticorpos monoclonais completamente humanos de 20P1F12/TMPRSS2 podem ser gerados utilizando tecnologias de clonagem que empregam grandes bibliotecas combinatoriais de gene Ig humano (isto é, *phage display*) (Griffiths e Hoogenboom, Building an *in vitro* immune system: human antibodies from *phage display* libraries. Em: Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications in Man. Clark, M. (Ed.), Nottingham Academic, pp 45-64 (1993); Burton e Barbas, Human Antibodies from combinatorial libraries. Id., pp 65-82). Os anticorpos monoclonais completamente humanos de 20P1F12/TMPRSS2 podem também ser produzidos utilizando ratinhos transgénicos construídos para conter loci de gene de imunoglobulina humana como descrito no Pedido de Patente PCT WO98/24893, Jakobovits et al., publicado em 3 de Dezembro de 1997 (veja-se também, Kucherlapati e Jakobovits, 1998, *Exp. Opin. Invest. Drugs* 7(4): 607-614). Este método evita a manipulação *in vitro* requerida com a

tecnologia *phage display* e eficientemente produz anticorpos humanos autênticos de alta afinidade.

A reactividade de anticorpos de 20P1F12/TMPRSS2 com uma proteína de 20P1F12/TMPRSS2 pode ser estabelecida por um número de meios bem conhecidos, que incluem análises de Western blot, imunoprecipitação, ELISA e FACS utilizando, como apropriado, proteínas de 20P1F12/TMPRSS2, péptidos, células que expressam 20P1F12/TMPRSS2 ou extractos do mesmo.

Um anticorpo de 20P1F12/TMPRSS2 ou fragmento do mesmo descrito no presente documento pode ser marcado com um marcador detectável ou conjugado a uma segunda molécula, tais como um agente terapêutico ou citotóxico, e utilizado para seleccionar como alvo uma célula positiva de 20P1F12/TMPRSS2 (Vitetta, E.S. et al., 1993, Immunotoxin therapy, em DeVita, Jr., V.T. et al., eds, Cancer: Principles and Practice of Oncology, 4^a ed., J.B. Lippincott Co., Filadélfia, 2624-2636). Os marcadores detectáveis adequados incluem, mas não estão limitados a, um radioisótopo, um composto fluorescente, um composto bioluminescente, composto quimioluminescente, um quelante de metal ou uma enzima.

A proteína de 20P1F12/TMPRSS2 é uma protease de serina de superfície celular que pode estar envolvida em invasão e metástase de cancro da próstata e do cólon. Consequentemente, o 20P1F12/TMPRSS2 pode ser um alvo ideal para intervenção terapêutica. Seu domínio de protease extracelular pode ser um alvo de fármaco potencial, enquanto o domínio extracelular completo pode ser um potencial anticorpo terapêutico alvo. Portanto, a invenção proporciona várias composições imunoterápicas e métodos para tratar cancro da próstata e do cólon, que incluem terapêutica de anticorpos, vacinas *in vivo*, e abordagens imunoterapêuticos *ex vivo*, que utilizam polinucleótidos e

polipéptidos correspondentes a 20P1F12/TMPRSS2 e anticorpos anti-20P1F12//TMPRSS2.

Numa abordagem, anticorpos anti-20P1F12/TMPRSS2 podem ser utilizados para tratar cancro da próstata. Por exemplo, o anticorpo anti-20P1F12/TMPRSS2 não conjugado pode ser introduzido num paciente tal que o anticorpo se liga a 20P1F12/TMPRSS2 em células de cancro da próstata e media a destruição das células e do tumor. O mecanismo de acção terapêutico pode incluir citólise mediada por complemento, citotoxicidade celular dependente de anticorpo, alterar a função fisiológica de 20P1F12/TMPRSS2, e/ou a inibição de ligação a ligando ou vias de transducção de sinal. Os anticorpos anti-20P1F12/TMPRSS2 conjugados a agentes tóxicos tais como ricina, ou a agentes terapêuticos, pode também ser utilizados terapeuticamente para distribuir o agente terapêutico ou tóxico directamente a células de tumor de próstata que suportam 20P1F12/TMPRSS2 e por meio disso destruir o tumor.

A imunoterapêutica do cancro da próstata utilizando anticorpos anti-20P1F12/TMPRSS2 pode seguir os ensinamentos gerados de várias abordagens que foram com sucesso utilizadas com respeito a outros tipos de cancro, que incluem, mas não estão limitados a cancro do cólon (Arlen et al., 1998, Crit Rev Immunol 18: 133-138), mieloma múltiplo (Ozaki et al., 1997, Blood 90: 3179-3186; Tsunenari et al., 1997, Blood 90: 2437-2444), cancro do estômago (Kasprzyk et al., 1992, Cancer Res 52: 2771-2776), linfoma de célula B (Funakoshi et al., 1996, J Immunther Emphasis Tumor Immunol 19: 93-101), leucemia (Zhong et al., 1996, Leuk Res 20: 581-589), cancro colo-rectal (Moun et al., 1994, Cancer Res 54: 6160-6166); Velders et al., 1995, Cancer Res 55: 4398-4403), e cancro de mama (Shepard et al., 1991, J Clin Immunol 11:117-127).

Os anticorpos de 20P1F12/TMPRSS2 podem ser introduzidos num paciente tal que o anticorpo se liga a

20P1F12/TMPRSS2 nas células de cancro e media a destruição das células e do tumor e/ou inibe o crescimento das células ou do tumor. Os mecanismos pelos quais tais anticorpos exercem um efeito terapêutico pode incluir a citólise mediada por complemento, citotoxicidade celular dependente de anticorpo, modular a função fisiológica de 20P1F12/TMPRSS2, inibir a ligação a ligando ou vias de transducção de sinal, modular diferenciação celular do tumor, alterar os perfis de factor de angiogênese tumoral, e/ou pela indução da apoptose. Os anticorpos 20P1F12/TMPRSS2 conjugados a agentes terapêuticos ou tóxicos podem também ser utilizados terapeuticamente para distribuir o agente terapêutico ou tóxico directamente às células de tumor que suportam 20P1F12/TMPRSS2.

Embora a terapêutica de anticorpo de 20P1F12/TMPRSS2 pode ser útil para todos os estágios dos anteriores cancros, a terapêutica de anticorpos pode ser particularmente apropriada em cancros da próstata avançados ou metastáticos. Em particular, por causa do gene de 20P1F12/TMPRSS2 parecer não estar regulado pelo androgénio, a terapêutica de anticorpo anti-20P1F12/TMPRSS2 pode ser utilizada para tratar pacientes sob terapêutica de ablação de androgénio. Combinando o método de terapêutica de anticorpos da invenção com um regime quimioterapêutico pode ser preferido em pacientes que não receberam tratamento quimioterapêutico, considerando que o tratamento com a terapêutica de anticorpos da invenção pode ser indicada para pacientes que receberam um ou mais quimioterapêuticos. Adicionalmente, a terapêutica de anticorpos pode também capacitar a utilização de doses reduzidas de quimioterapêutica concomitante, particularmente em pacientes que não toleram a toxicidade do agente quimioterapêutico muito bem.

Pode ser desejável para pacientes a serem avaliados para a presença e nível de 20P1F12/TMPRSS2, preferentemente

utilizando avaliações imunohistoquímicas de tecido de tumor, formação de imagem quantitativa de 20P1F12/TMPRSS2, ou outras técnicas capazes de indicação confiável da presença e grau de expressão. A análise imunohistoquímica de biopsias de tumor ou espécimes cirúrgicos pode ser preferida para este propósito. Métodos para análise imunohistoquímica de tecidos de tumor são bem conhecidos na técnica.

Os anticorpos monoclonais anti-20P1F12/TMPRSS2 úteis em tratar cancros da próstata incluem aqueles que são capazes de iniciar uma potente resposta imune contra o tumor e aqueles que são capazes de citotoxicidade directa. Em relação a isso, os mAbs anti-20P1F12/TMPRSS2 podem eliciar a lise celular do tumor por ou mecanismos mediados por complemento ou de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), ambos os quais requerem uma porção Fc intacta da molécula de imunoglobulina para interacção com sítios de receptor Fc de células efetoras ou proteínas de complemento. Ademais, os mAbs anti-20P1F12/TMPRSS2 que exercem um efeito biológico directo sobre o crescimento do tumor são úteis na prática da invenção. Os mecanismos potenciais pelos quais tais mAbs directamente citotóxicos possam actuar incluem a inibição do crescimento celular, modulação da diferenciação celular, modulação de perfis de factor de angiogênese de tumor, e a indução da apoptose. O mecanismo pelo qual um mAb anti-20P1F12/TMPRSS2 particular exerce um efeito anti-tumor pode ser avaliado utilizando qualquer número de ensaios *in vitro* desenhados para determinar ADCC e lise celular mediada por complemento, bem como inibição do crescimento, modulação de apoptose e inibição de diferenciação, e/ou inibição de angiogênese, como é geralmente conhecido na técnica.

A actividade anti-tumoral de um mAb anti-20P1F12/TMPRSS2 particular, ou combinação de mAb anti-20P1F12/TMPRSS2, pode ser avaliada *in vivo* utilizando um

modelo animal adequado. Por exemplo, modelos de cancro da próstata xenogénico em que explantes de cancro da próstata humano ou tecidos de xenoenxerto de passagem são introduzidos em animais imunocomprometidos, tais como ratinhos atímicos ou SCID, são apropriados em relação a cancro da próstata e foram descritos (Klein et al., 1997, Nature Medicine 3: 402-408). Por exemplo, o pedido de Patente PCT WO98/16628, Sawyers et al., publicado em 23 de Abril de 1998, descreve vários modelos de xenoenxerto de cancro da próstata humano capazes de recapitular o desenvolvimento de tumores primários, micrometástase, e a formação de metástases osteoblásticas características de doença em estágio tardio. A eficácia pode ser predicta utilizando a inibição da formação de tumor, regressão tumoral, metástase, e similares.

Deve-se notar que a utilização de anticorpos monoclonais murinos ou outros não humanos, mAb quiméricos humanos/de ratinhos podem induzir respostas imunes de moderadas a fortes em alguns pacientes. Nos casos mais graves, tal resposta imune pode levar à formação extensiva de complexos imunes que, potencialmente, podem causar insuficiência renal. Consequentemente, os anticorpos monoclonais preferidos utilizados na prática dos métodos terapêuticos da invenção são aqueles que são ou completamente humanos ou humanizados e que se ligam especificamente ao抗原 20P1F12/TMPRSS2 alvo com alta afinidade, mas que exibem baixa ou nenhuma antigenicidade no paciente.

O método da invenção contempla a administração de mAb anti-20P1F12/TMPRSS2 sozinhos bem como em combinações, ou "cocktails", de diferentes mAb. Tais cocktails de mAb podem ter certas vantagens na medida em que como contêm mAb que exploram uma diferente especificidade de epítopo, diferentes mecanismos efectores, ou combinam directamente mAb citotóxicos com mAb que se baseiam na funcionalidade

efectora imune. Tais mAb em combinação podem exibir efeitos terapêuticos sinergéticos. Ademais, a administração de mAb anti-20P1F12/TMPRSS2 pode ser combinada com outros agentes terapêuticos ou radiação terapêutica, que incluem, mas não estão limitados a vários agentes quimioterapêuticos, bloqueadores de androgénio, e moduladores imunes (por exemplo, IL-2, GM-CSF). Os mAb anti-20P1 F12/TMPRSS2 podem ser administrados em sua forma "nu" ou não conjugada, ou podem ter agentes terapêuticos ou tóxicos conjugados aos mesmos.

Os anticorpos monoclonais anti-20P1F12/TMPRSS2 utilizados na prática do método da invenção podem ser formulados em composições farmacêuticas que compreendem um transportador adequado para o desejado método de distribuição. Os transportadores adequados incluem qualquer material que quando combinado com os mAb anti-20P1F12/TMPRSS2 retêm a especificidade e função anti-tumor do anticorpo e não são reactivos com os sistemas imunes do sujeito. Os exemplos incluem, mas não estão limitados a, qualquer de um número dos transportadores farmacêuticos padrão tais como soluções salinas tamponadas com fosfato estéreis, água bacteriostática, e similares.

As formulações de anticorpo anti-20P1F12/TMPRSS2 podem ser administradas pôe meio de qualquer via capaz de distribuir os anticorpos ao local do tumor. As vias potencialmente efectivas de administração incluem, mas não estão limitados a, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intratumoral, intradérmica, e similares. A rota preferida de administração é por injecção intravenosa. Uma formulação preferida para injecção intravenosa comprehende o mAb anti-20P1F12/TMPRSS2 numa solução de água bacteriostática preservada, água não preservada estéril, e/ou diluída em cloreto de polivinilo ou bolsas de polietileno que contém 0,9% de cloreto de sódio estéril para injecção, USP. A preparação de mAb anti-

20P1F12/TMPRSS2 pode ser liofilizada e armazenada como um pó estéril, preferentemente sob vácuo, e então reconstituída em água bacteriostática que contém, por exemplo, conservante de álcool benzílico, ou em água estéril antes da injecção.

O tratamento envolverá geralmente a administração repetida da preparação de anticorpo anti-20P1F12/TMPRSS2 por meio de uma via aceitável de administração tal como injecção intravenosa (IV), tipicamente numa dose no intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg em peso corporal. As doses no intervalo de 10-500 mg de mAb por semana podem ser efectivas e bem toleradas. Com base na experiência clínica com o mAb Herceptina no tratamento de cancro de mama metastático, uma dose de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg em peso corporal do paciente IV seguido de doses semanais de aproximadamente 2 mg/kg IV da preparação de mAb anti-20P1F12/TMPRSS2 podem representar um regime de dosagem aceitável. Preferentemente, a dose de carga inicial é administrada como uma infusão de 90 minutos ou mais longa. A dose de manutenção periódica pode ser administrada como uma infusão de 30 minutos ou mais longa, com a condição de que a dose inicial fosse bem tolerada. Contudo, como um perito na especialidade entenderá, vários factores influenciarão o regime de dose ideal num caso particular. Tais factores podem incluir, por exemplo, a afinidade de ligação e semivida do mAb ou dos mAb utilizado(s), o grau de sobre-expressão de 20P1F12/TMPRSS2 no paciente, a extensão de antigénio de 20P1F12/TMPRSS2 livre em circulação, o desejado nível de concentração de anticorpo em estado estacionário, a frequência do tratamento, e a influência de agentes quimioterapêuticos utilizados em combinação com o método de tratamento da invenção.

Optimamente, os pacientes deveriam ser avaliados para o nível de antigénio de 20P1F12/TMPRSS2 livre em circulação

em soro a fim de assistir na determinação do regime de dosagem mais efectivo e factores relacionados. Tais avaliações podem também ser utilizadas para propósitos de monitorização ao longo da terapéutica, e podem ser úteis para calibrar o sucesso terapêutico em combinação com a avaliação de outros parâmetros (tais como níveis de PSA sérico em terapêutica de cancro da próstata).

Descrevem-se também vacinas contra cancro da próstata que compreendem uma proteína de 20P1F12/TMPRSS2 ou fragmento do mesmo. A utilização de um antígeno de tumor numa vacina para gerar imunidade humoral e mediada por célula para utilização em terapêutica anti-cancro é bem conhecida na técnica e foi empregada em cancro da próstata utilizando PSMA humano e imunogénios PAP de roedores (Hodge et al., 1995, Int. J. Cancer 63: 231-237; Fong et al., 1997, J. Immunol. 159: 3113-3117). Tais métodos podem ser prontamente praticados pelo emprego de uma proteína de 20P1F12/TMPRSS2, ou fragmento do mesmo, ou um 20P1F12/TMPRSS2 - que codifica molécula de ácido nucleico e vectores recombinantes capazes de expressar e apresentar apropriadamente o imunogénio de 20P1F12/TMPRSS2.

Por exemplo, sistemas de distribuição de gene viral podem ser utilizados para distribuir um 20P1F12/TMPRSS2 - que codifica molécula de ácido nucleico. Vários sistemas de distribuição de gene viral que podem ser utilizados na prática deste aspecto da invenção incluem, mas não estão limitados a, vaccinia, fowlpox, canarypox, adenovirus, influenza, poliovirus, vírus adeno-associado, lentivirus, e vírus sindbus (Restifo, 1996, Curr. Opin. Immunol. 8: 658-663). Os sistemas de distribuição não virais podem também ser empregados pela utilização de ADN nu que codifica uma proteína de 20P1F12/TMPRSS2 ou fragmento do mesmo introduzido no paciente (por exemplo, intramuscularmente) para induzir uma resposta anti-tumoral. Numa concretização, o ADNc de 20P1F12/TMPRSS2 de comprimento completo humano

pode ser empregado. Em outra concretização, moléculas de ácido nucleico de 20P1F12/TMPRSS2 que codifica epítopos de linfócito T citotóxico específico (CTL) podem ser empregadas. Os epítopos de CTL podem ser determinados utilizando algoritmos específicos (por exemplo, Epimer, Universidade de Brown) para identificar péptidos dentro de uma proteína de 20P1F12/TMPRSS2 que são capazes de optimamente ligar-se a alelos HLA especificados.

Várias estratégias *ex vivo* podem também ser empregadas. Uma abordagem envolve a utilização de células dendríticas para apresentar抗igénio de 20P1F12/TMPRSS2 a um sistema imune de paciente. As células dentríticas expressam MHC de classe I e II, co-estimulador B7, e IL-12, e são assim células apresentadoras de抗igénio altamente especializadas. Em cancro da próstata, células dentríticas autólogas pulsadas com péptidos do Antigénio de Membrana Específico da Próstata (PSMA) estão sendo utilizadas num ensaio clínico de Fase I para estimular os sistemas imunes dos pacientes com cancro da próstata (Tjoa et al., 1996, Prostate 28: 65-69; Murphy et al., 1996, Prostate 29: 371-380). As células dendríticas podem ser utilizadas para apresentar péptidos de 20P1F12/TMPRSS2 a células T no contexto de moléculas MHC de classe I e II. Numa concretização, células dendríticas autólogas são pulsadas com péptidos de 20P1F12/TMPRSS2 capazes de ligar-se a moléculas MHC. Em outra concretização, as células dendríticas são pulsadas com a proteína completa de 20P1F12/TMPRSS2. Ainda outra concretização envolve a construção da sobre-expressão do gene de 20P1F12/TMPRSS2 em células dendríticas utilizando vários vectores de implementação conhecidos na técnica, tais como adenovírus (Arthur et al., 1997, Cancro Gene Ther. 4: 17-25), retrovírus (Henderson et al., 1996, Cancer Res. 56: 3763-3770), lentivírus, vírus adeno-associado, transfecção de ADN (Ribas et al., 1997, Cancer Res. 57: 2865-2869), e

transfecção de ARN derivado de tumor (Ashley *et al.*, 1997, *J. Exp. Med.* 186: 1177-1182).

Os anticorpos anti-idiotípicos anti-20P1F12/TMPRSS2 podem também ser utilizados em terapêutica anti-cancro como uma vacina para induzir uma resposta imune a células que expressam uma proteína de 20P1F12/TMPRSS2. Especificamente, a geração de anticorpos anti-idiotípicos é bem conhecida na técnica e pode prontamente ser adaptada para gerar anticorpos anti-idiotípicos anti-20P1 F12/TMPRSS2 que imitam um epítopo sobre uma proteína de 20P1F12/TMPRSS2 (veja-se, por exemplo, Wagner *et al.*, 1997, *Hybridoma* 16: 33-40; Foon *et al.*, 1995, *J Clin Invest* 96: 334-342; Herlyn *et al.*, 1996, *Cancer Immunol Immunother* 43: 65-76). Tal anticorpo anti-idiotípico pode ser utilizado em terapêutica anti-idiotípica como praticado no presente momento com outros anticorpos anti-idiotípicos direcionados contra抗igénios de tumor.

Os métodos de imunização genética podem ser utilizados para gerar respostas imunes profiláticas ou terapêuticas humoral e celular direcionadas contra células de cancro que expressam 20P1F12/TMPRSS2, particularmente células de cancro da próstata e do cólon. Constructos que compreendem ADN que codifica uma proteína/imunogénio de 20P1F12/TMPRSS2 e sequências reguladoras apropriadas podem ser injectados directamente no músculo ou na pele de um indivíduo, tal que as células do músculo ou da pele absorvam o constructo e expressem a proteína/imunogénio de 20P1F12/TMPRSS2 codificada. A proteína/imunogénio de 20P1F12/TMPRSS2 pode ser expressa como uma proteína de superfície celular ou ser secretada. A expressão da proteína/imunogénio de 20P1F12/TMPRSS2 resulta na geração de imunidade profilática ou terapêutica humoral e celular contra cancro da próstata. Várias técnicas de imunização genética profilática e terapêutica conhecidas na técnica podem ser utilizadas

(para revisão, veja-se informação e referências publicadas no endereço de internet www.genweb.com) .

Outro aspecto da invenção é direcionado a métodos de diagnóstico molecular e de diagnóstico por imagem que utilizam os polinucleótidos de 20P1F12/TMPRSS2 e anticorpos descritos no presente documento. O perfil de expressão e localização de superfície celular de 20P1F12/TMPRSS2 torna-o um potencial reagente de imagem para a doença metastasiada. O 20P1F12/TMPRSS2 é expresso em vários tecidos de xenoenxerto de cancro da próstata e linhas celulares, e é também expresso em algumas linhas celulares de cancro do cólon. O estado de expressão de 20P1F12/TMPRSS2 pode proporcionar informação útil para localizar tumores, predizer susceptibilidade à doença em estágio avançado, e/ou calibrar a agressividade do tumor. O estado de expressão de 20P1F12/TMPRSS2 em amostras de paciente pode ser analisado por, por exemplo: (i) análise imunohistoquímica, (ii) hibridação *in situ*, (iii) análise de RT-PCR em amostras micro-dissecadas por captura a laser, (iv) análise de western blot de amostras clínicas e linhas celulares, (v) análise de arranjo de tecido, (vi) formação de imagem *in vivo*. Vários ensaios imunológicos úteis para a detecção de proteínas de 20P1F12/TMPRSS2 estão contemplados, que incluem, mas não estão limitados a vários tipos de radioimunoensaios, ensaios imunoabsorventes ligados a enzima (ELISA), ensaios imunofluorescentes ligados a enzima (ELIFA), métodos imunocitoquímicos, e similares. Como um exemplo, os anticorpos de 20P1F12/TMPRSS2 podem ser marcados e utilizados como reagentes imunológicos de formação de imagem capazes de detectar células do cancro da próstata e do cólon (por exemplo, em métodos radiocintigráficos de formação de imagem). Para formação de imagem radiocintigráfica *in vivo*, anticorpos radiomarcados com 20P1F12/TMPRSS2

especificamente reactivos com epítopos extracelulares de 20P1 F12/TMPRSS2 são preferidos.

Os ensaios para identificar células de próstata, cancro da próstata ou cancro do cólon compreendem detectar polinucleótidos correspondentes ao gene de 20P1F12/TMPRSS2 numa amostra biológica, tal como soro, osso, próstata, cólon e outros tecidos, urina, sémen, preparações celulares e similares. Os polinucleótidos detectáveis de 20P1F12/TMPRSS2 incluem, por exemplo, um gene de 20P1F12/TMPRSS2 ou fragmentos do mesmo, ARNm de 20P1F12/TMPRSS2, ARNm de 20P1F12/TMPRSS2 variante de splice alternativo, e moléculas de ADN ou ARN recombinantes que contém um polinucleótido de 20P1F12/TMPRSS2. Um número de métodos para amplificar e/ou detectar a presença de polinucleótidos 20P1 F12/TMPRSS2 são bem conhecidos na técnica e podem ser empregados na prática deste aspecto da invenção.

Numa concretização, um método para detectar um ARNm de 20P1F12/TMPRSS2 numa amostra biológica compreende produzir ADNc da amostra por transcrição reversa utilizando pelo menos um iniciador; amplificar o ADNc assim produzido utilizando polinucleótidos de 20P1F12/TMPRSS2 como iniciadores sense e anti-sense para amplificar ADNc de 20P1 F12/TMPRSS2 no mesmo; e detectar a presença do ADNc de 20P1F12/TMPRSS2 amplificado. Em outra concretização, um método de detecção de um gene de 20P1 F12/TMPRSS2 numa amostra biológica compreende primeiro isolar o ADN genómico da amostra; amplificar o ADN genómico isolado utilizando polinucleótidos de 20P1F12/TMPRSS2 como iniciadores sense e anti-sense para amplificar o gene de 20P1 F12/TMPRSS2 no mesmo; e detectar a presença do gene de 20P1F12/TMPRSS2 amplificado. Qualquer número de combinações de sondas sense e anti-sense apropriadas pode ser desenhado a partir da sequência de nucleótidos proporcionada para o

20P1F12/TMPRSS2 (FIG. 1; SEQ ID NO. XX) e utilizadas para este propósito.

Em outra concretização, um método de detecção da presença de uma proteína de 20P1F12/TMPRSS2 numa amostra biológica comprehende primeiro contactar a amostra com um anticorpo de 20P1F12/TMPRSS2, um fragmento reactivo de 20P1F12/TMPRSS2 do mesmo, ou uma proteína recombinante que contém uma região de ligação a antigénio de um anticorpo de 20P1F12/TMPRSS2; e então detectar a ligação da proteína de 20P1F12/TMPRSS2 na amostra ao mesmo.

Métodos para identificar uma célula que expressa 20P1F12/TMPRSS2 são também proporcionados. Numa concretização, um ensaio para identificar uma célula que expressa um gene de 20P1F12/TMPRSS2 comprehende detectar a presença de ARNm de 20P1F12/TMPRSS2 na célula. Métodos para a detecção de ARNm particulares em células são bem conhecidos e incluem, por exemplo, ensaios de hibridação utilizando sondas de ADN complementar (tais como hibridação *in situ* utilizando ribosondas de 20P1F12/TMPRSS2 marcadas, Northern blot e técnicas relacionadas) e vários ensaios de amplificação de ácidos nucleicos (tais como RT-PCR utilizando iniciadores complementares específicos para 20P1F12/TMPRSS2, e outros métodos de detecção de tipo amplificação, tais como, por exemplo, ADN ramificado, SISBA, TMA e similares). Alternativamente, um ensaio para identificar uma célula que expressa um gene de 20P1F12/TMPRSS2 comprehende detectar a presença de proteína de 20P1F12/TMPRSS2 na célula ou secretada pela célula. Vários métodos para a detecção de proteínas são bem conhecidos na técnica e podem ser empregados para a detecção de proteínas de 20P1F12/TMPRSS2 e 20P1F12/TMPRSS2 que expressam células.

A determinação do estado de padrões de expressão de 20P1F12/TMPRSS2 num indivíduo pode ser utilizada para diagnosticar cancro e pode proporcionar informação

prognóstica útil na definição de opções terapêuticas apropriadas. De maneira similar, o estado de expressão de 20P1F12/TMPRSS2 pode proporcionar informação útil para predizer susceptibilidade a estágios particulares da doença, progressão, e/ou agressividade do tumor. Portanto, outro aspecto da invenção proporciona métodos e ensaios para determinar o estado de expressão de 20P1F12/TMPRSS2 e diagnosticar cancros que expressem 20P1F12/TMPRSS2.

Numa concretização, um ensaio útil na determinação da presença de cancro num indivíduo comprehende detectar um aumento significativo em ARNm de 20P1F12/TMPRSS2 ou expressão de proteína numa célula de teste ou amostra de tecido em relação a níveis de expressão na correspondente célula ou tecido normal. A presença de ARNm de 20P1F12/TMPRSS2 numa amostra de cólon, por exemplo, pode indicar a emergência, presença e/ou gravidade do cancro do cólon, uma vez que o cólon normal não expressa 20P1F12/TMPRSS2. Numa concretização relacionada, o estado de expressão de 20P1F12/TMPRSS2 pode ser determinado no nível de proteína ao invés do nível de ácido nucleico. Por exemplo, tal método ou ensaio compreenderia determinar o nível de proteína de 20P1F12/TMPRSS2 expressado pelas células numa amostra de tecido de teste e comparar o nível assim determinado ao nível de 20P1F12/TMPRSS2 expressado numa correspondente amostra normal. A presença de proteína de 20P1F12/TMPRSS2 pode ser avaliada, por exemplo, utilizando métodos de imunohistoquímica. Os anticorpos de 20P1F12/TMPRSS2 ou parceiros de ligação capazes de detectar a expressão de proteína de 20P1F12/TMPRSS2 podem ser utilizados numa variedade de formatos de ensaio bem conhecidos na técnica para este propósito.

O sangue periférico pode ser convenientemente testado para a presença de células de cancro da próstata ou do cólon, utilizando RT-PCR para detectar a expressão de 20P1F12/TMPRSS2 no mesmo. A presença de ARNm de

20P1F12/TMPRSS2 amplificável por RT-PCR pode indicar a presença de um destes cancros. Os ensaios de detecção por RT-PCR para células tumorais em sangue periférico estão actualmente sendo avaliados para utilização no diagnóstico e gestão de um número de tumores sólidos humanos. No campo de cancro da próstata, estes incluem ensaios de RT-PCR para a detecção de células que expressam PSA e PSM (Verkaik et al., 1997, Urol. Res. 25: 373-384; Ghossein et al., 1995, J. Clin. Oncol. 13: 1195-2000; Heston et al., 1995, Clin. Chem. 41: 1687-1688). Os ensaios de RT-PCR são bem conhecidos na técnica.

Nutra abordagem, um ensaio sensível recentemente descrito para detectar e caracterizar células de carcinoma em sangue pode ser utilizado (Racila et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 4589-4594). Este ensaio combina o enriquecimento imunomagnético com análises imunohistoquímicos e citométricos de fluxo multiparamétrico, e é altamente sensível para a detecção de células de cancro em sangue, capazes reportadamente de detectar uma célula epitelial em 1 ml de sangue periférico.

Os métodos para detectar e quantificar a expressão de ARNm de 20P1F12/TMPRSS2 ou proteína são descritos no presente documento e utilizam tecnologias padrão de detecção e quantificação de ácido nucleico e proteína bem conhecidas na técnica. Os métodos padrão para a detecção e quantificação de ARNm de 20P1F12/TMPRSS2 incluem hibridação *in situ* utilizando ribossondas de 20P1F12/TMPRSS2 marcadas, Northern blot e técnicas relacionadas utilizando sondas de polinucleótido de 20P1F12/TMPRSS2, análise de RT-PCR utilizando iniciadores específicos para 20P1F12/TMPRSS2, e outros métodos de detecção de tipo amplificação, tais como, por exemplo, ADN ramificado, SISBA, TMA e similares. Numa concretização específica, o RT-PCR semiquantitativo pode ser utilizado para detectar e quantificar a expressão de ARNm de 20P1F12/TMPRSS2 como descrito nos exemplos que

seguem. Qualquer número de iniciadores capazes de amplificar 20P1F12/TMPRSS2 pode ser utilizado para este propósito, que incluem, mas não estão limitados aos vários conjuntos de iniciadores especificamente descritos no presente documento. Os métodos padrão para a detecção e quantificação de proteína podem ser utilizados para este propósito. Numa concretização específica, anticorpos policlonais ou monoclonais especificamente reactivos com a proteína de 20P1F12/TMPRSS2 podem ser utilizados num ensaio imunohistoquímico de tecido biopsado.

Descrevem-se também kits para aplicações de diagnóstico e terapêuticas descritas ou sugeridas acima. Tais kits podem compreender um meio transportador que está compartmentalizado para receber em confinamento íntimo um ou mais meios contentores tais como frascos, tubos e similares, cada um dos meios contentores compreendendo um dos elementos separados a serem utilizados no método. Por exemplo, um dos meios contentores pode compreender uma sonda que é ou pode ser marcada de modo detectável. Tal sonda pode ser um antícorpo ou polinucleotídeo específico para a proteína ou gene/ARNm de 20P1F12/TMPRSS2, respectivamente. Onde o kit utiliza hibridação de ácido nucleico para detectar o ácido nucleico alvo, o kit pode também ter contentores que contêm nucleotídeo(s) para amplificação da sequência de ácido nucleico alvo e/ou um contentor que compreende um meio repórter, tal como uma proteína de ligação a biotina, tal como avidina ou estreptavidina, ligada a uma molécula repórter, tal como um marcador enzimático, fluorescente, ou de radionucleotídeo.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1: ISOLAMENTO DE ADNc CORRESPONDENTE AO GENE 20P1F12/TMPRSS2 POR CLONAGEM POR HIBRIDAÇÃO SSH E ANÁLISE DE EXPRESSÃO

MATERIAIS E MÉTODOS

Linhas celulares e Tecidos Humanos

Todas as linhas celulares de cancro humanas utilizadas neste estudo foram obtidas da ATCC. Todas as linhas celulares foram mantidas em DMEM com 10% de soro fetal bovino. PrEC (células primárias epiteliais de próstata) foram obtidas de Clonetics e foram cultivadas em meio PrEBM suplementado com factores de crescimento (Clonetics).

Todos os xenoenxertos de cancro da próstata humanos foram proporcionados originariamente por Charles Sawyers (UCLA) (Klein et al., 1997). Os xenoenxertos LAPC-4 AD e LAPC-9 AD foram passados de forma rotineira como pequenos pedaços de tecido em recipientes SCID macho. Os xenoenxertos LAPC-4 Al e LAPC-9 Al foram derivados como descritos anteriormente (Klein et al., 1997) e foram passados em ratinhos SCID fêmeas ou machos castrados.

Os tecidos humanos para análises de ARN e proteína foram obtidos do Centro de Recursos em Tecidos Humanos (HTRC) na UCLA (Los Angeles, CA) e de QualTek, Inc. (Santa Barbara, CA). Uma amostra de tecido de hiperplasia prostática benigna foi derivada de uma paciente.

Isolamento de ARN:

Tecidos tumorais e linhas celulares foram homogeneizados em reagente Trizol (Life Technologies, Gibco BRL) utilizando 10 ml/g de tecido ou 10 ml/ 10^8 células para isolar ARN total. Poli A ARN foi purificado do ARN total utilizando Qiagen's Oligotex ARNm Mini e Midi kits. O ARNm e total foram quantificados por meio de análise espectrofotométrica (D.O. 260/280 nm) e analisados por meio de electroforese em gel.

Oligonucleótidos:

Os seguintes oligonucleótidos purificados por meio de HPLC foram utilizados.

RSACDN (iniciador de síntese de ADNc):

5' TTTTGTACAAGCTT₃₀3'

Adaptador 1:

5'CTAATACGACTCACTATAAGGGCTCGAGCGGCCGCCGGCAGGT3'
3'GGCCCGTCCA5'

Adaptador 2:

5'CTAATACGACTCACTATAAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT3'
3'CGGCTCCA5'

iniciador de PCR 1:

5' CTAATACGACTCACTATAAGGC3'

iniciador nested (NP) 1:

5'TCGAGCGGCCGCCGGCAGGT3'

iniciador nested (NP) 2:

5' AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT3'

Hibridação subtractiva supressiva:

Hibridação subtractiva supressiva (SSH) foi utilizada para identificar ADNc correspondentes aos genes que podem ser regulados positivamente em cancro de próstata dependente de androgénio em comparação com hiperplasia prostática benigna.

ADNc de cadeia dupla correspondentes ao xenoenxerto LAPC-4 AD ("tester") e o tecido BPH (condutor) foram sintetizados a partir de 2 µg de ARN poli(a)* isolado de xenoenxerto e tecido BPH, como descritos anteriormente, utilizando Kit de Subtracção de ADNc PCR-Select de CLONTECH e 1 ng de oligonucleótido RSACDN como iniciador. A síntese da primeira cadeia e da segunda cadeia foram levadas a cabo como descrito no protocolo do manual do utilizador do kit (Protocolo de CLONTECH N.º PT1117-1, N.º de Catálogo K1804-1). O ADNc resultante foi digerido com Rsa I durante 3 h a 37°C. O ADNc digerido foi extraído com fenol/clorofórmio (1:1) e etanol precipitado.

O ADNc "driver" (BPH) foi gerado pela combinação numa razão 4 para 1 de BPH ADNc digerido com Rsa I com ADNc digerido de fígado de ratinho, a fim de assegurar que os genes murinos foram subtraídos do ADNc "tester" (LAPC-4 AD).

O ADNC "tester" (LAPC-4 AD) foi gerado pela diluição de 1 μ l de LAPC-4 AD ADNC digerido com Rsa I (400 ng) em 5 μ l de água. O ADNC diluído (2 μ l, 160 ng) então foi ligado a 2 μ l de adaptador 1 e adaptador 2 (10 μ M), em reacções de ligação separadas, num volume total de 10 μ l a 16°C durante a noite, utilizando 400 u de T4 DNA ligase (CLONTECH). A ligação foi interrompida com 1 μ l de 0,2 M EDTA e aquecimento a 72°C durante 5 min.

A primeira hibridação foi realizada pela adição de 1,5 μ l (600 ng) de ADNC "driver" a cada um de dois tubos que continham 1,5 μ l (20 ng) de ADNC "tester" ligado a adaptador 1- e adaptador 2-. Num volume final de 4 μ l, as amostras foram sobrepostas com óleo mineral, desnaturadas num ciclador térmico de MJ Research a 98°C durante 1,5 minutos, e então foram deixadas hibridizar durante 8 h a 68°C. As duas hibridizações então foram misturadas junto com um 1 μ l adicional de ADNC "driver" desnaturado fresco e foram deixadas hibridizar durante a noite a 68°C. A segunda hibridação então foi diluída em 200 μ l de Hepes 20 mM, pH 8,3, NaCl 50 mM, EDTA 0,2 mM, aquecida a 70°C durante 7 min. e armazenada a -20°C.

Amplificação por PCR, Clonagem e Sequenciação de Fragmentos de gene gerados a partir de SSH:

Para amplificar fragmentos de gene que resultam das reacções SSH, duas amplificações por PCR foram realizadas. Na reacção de PCR primária 1 μ l da mistura de hibridação final diluída foi adicionada a 1 μ l de iniciador de PCR 1 (10 μ M), 0,5 μ l de dNTP mix (10 μ M), 2,5 μ l de 10 x tampão de reacção (CLONTECH) e 0,5 μ l de 50 x Advantage ADNC polimerase Mix (CLONTECH) num volume final de 25 μ l. A PCR 1 foi conduzida utilizando as seguintes condições: 75°C durante 5 min., 94°C durante 25 seg, então 27 ciclos de 94°C durante 10 seg, 66°C durante 30 seg, 72°C durante 1,5 min. Cinco reacções de PCR primárias separadas foram realizadas para cada experiência. Os produtos foram

agrupados e diluídos 1:10 com água. Para a reacção de PCR secundária, 1 µl da reacção de PCR primária agrupada e diluída foi adicionado à mesma mistura de reacção como utilizado para PCR 1, excepto que iniciadores NP1 e NP2 (10 µM) foram utilizados ao invés de iniciador de PCR 1. A PCR 2 foi realizada utilizando 10-12 ciclos de 94°C durante 10 seg, 68°C durante 30 seg, 72°C durante 1,5 minutos. Os produtos de PCR foram analisados utilizando electroforese em gel de agarose a 2%.

Os produtos de PCR foram inseridos no pCR2.1 utilizando o kit de clonagem de vector T/A (Invitrogen). *E. coli* transformadas foram submetidas a selecção azul/branco e ampicilina. As colónias brancas foram inoculadas em placas de 96 poços e cresceram em cultura líquida durante a noite. Para identificar os insertos, a amplificação por PCR foi realizada em 1 ml de cultura bacteriana utilizando as condições de PCR1 e NP1 e NP2 como iniciadores. Os produtos de PCR foram analisados utilizando electroforese em gel de agarose a 2%.

Os clones bacterianos foram armazenados em glicerol a 20% num formato de 96 poços. O ADN de plasmídeo foi preparado, sequenciado, e submetido a investigações de homologia de ácido nucleico das bases de dados GenBank, dBest, e NCI-CGAP.

Análise de expressão por RT-PCR:

As primeiras cadeias de ADNc foram geradas a partir de 1 µg de ARNm com iniciação com oligo (dT)12-18 utilizando o sistema Gibco-BRL Superscript Preamplification. O protocolo do fabricante foi utilizado para e incluía uma incubação durante 50 min a 42°C com transcriptase reversa seguido por tratamento com RNase H a 37°C durante 20 min. Após completar a reacção, aumentou-se o volume até 200 µl com água antes da normalização. As primeiras cadeias de ADNc de 16 diferentes tecidos humanos normais foram obtidas de Clontech.

A normalização das primeiras cadeias de ADNc de múltiplos tecidos foi realizada pela utilização dos iniciadores 5'atatcgccgcgtcgacaa3' e 5'agccacacgcagctcattgtagaagg 3' para amplificar β -actina. A primeira cadeia de ADNc (5 μ l) foi amplificada num volume total de 50 μ l contendo iniciadores de 0,4 μ M, dNTPs de 0,2 μ M cada um, 1X tampão de PCR (Clontech, Tris-HCL 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, pH 8,3) e 1X Klentaq ADN polimerase (Clontech). Cinco μ l da reacção de PCR foram retirados a 18, 20, e 22 ciclos e utilizado para electroforese em gel de agarose. A PCR foi realizada utilizando um ciclador térmico MJ Research sob as seguintes condições: desnaturação inicial foi a 94°C durante 15 seg, seguido por um 18, 20, e 22 ciclos de 94°C durante 15, 65°C durante 2 min, 72°C durante 5 seg. Uma extensão final a 72°C foi levada a cabo durante 2 min. Após a electroforese em gel de agarose, as intensidades de banda das bandas de β -actina de 283 bp de múltiplos tecidos foram comparadas por meio de inspecção visual. Os factores de diluição para os ADNc de primeira cadeia foram calculados para resultar em intensidades de banda de β -actina iguais em todos os tecidos após 22 ciclos de PCR. Três séries de normalização foram requeridas para alcançar intensidades de banda iguais em todos os tecidos após 22 ciclos de PCR.

Para determinar os níveis de expressão do gene 20P1F12, 5 μ l das primeiras cadeias de ADNc normalizadas foram analisados por meio de PCR utilizando 25, 30 e 35 ciclos de amplificação utilizando os seguintes pares de iniciador, que foram desenhados com a ajuda de (MIT; para detalhes, veja-se, www.genome.wi.mit.edu):

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

A análise de expressão semiquantitativa foi realizada pela comparação dos produtos de PCR a números de ciclo que deram intensidades de banda leve.

RESULTADOS:

Diversas experiências SSH foram realizadas como descritos nos Materiais e Métodos, *supra*, e levaram ao isolamento de numerosos clones de fragmento de gene candidatos. Todos os clones candidatos foram sequenciados e submetidos a análise de homologia contra todas as sequências nas principais bases de dados EST e de genes públicas a fim de proporcionar informação sobre a identidade do gene correspondente e ajudar a guiar a decisão para analisar um gene particular para expressão diferencial.

Um dos clones de ADNc, designado 20P1F12, mostrou identidade com uma serina protease TMPRSS2 recentemente descrita (Paoloni-Giacobino et al., 1997, Genomics 44: 309-320). O fragmento de ADNc 20P1F12 isolado é de 388 bp em comprimento e tem a sequência de nucleótidos mostrada na Fig. 4. A análise de expressão diferencial por meio de RT-PCR mostrou que o gene 20P1F12 é expresso em níveis aproximadamente iguais em próstata normal e os xenoenxertos LAPC-4 e LAPC-9 (FIG. 5, painel A). A análise de expressão de RT-PCR adicional dos ADNc de primeira cadeia de 16 tecidos normais mostrou maiores níveis de expressão de 20P1F12 em próstata. Uma expressão de nível substancialmente inferior foi observada em diversos outros tecidos normais (isto é, cólon, pâncreas, rim, fígado e pulmão) (FIG. 5, painéis B e C).

**EXEMPLO 2: ANÁLISE DE NORTHERN BLOT DE EXPRESSÃO DO GENE
20P1F12/TMPRSS2**

Análises de Northern blot num painel de 16 tecidos humanos normais utilizando uma sonda 20P1F12/TMPRSS2 marcada (correspondente ao ADNc de 20P1F12 SSH de FIG. 4) foram conduzidas para confirmar a especificidade de próstata da expressão de 20P1F12/TMPRSS2 inicialmente estabelecida por análise de expressão por RT-PCR. Os resultados, mostrados na Fig. 6 (Painéis A & B), confirmam

e estendem as análises de RT-PCR e mostram que a expressão de 20P1F12/TMPRSS2 é relativamente específica de próstata, já que a expressão em próstata é claramente muitas vezes superior a expressão em pulmão, rim, pâncreas ou cólon, onde somente uma expressão de nível muito baixo é detectado. Não observou-se expressão detectável em qualquer dos outros 11 tecidos normais utilizado neste painel.

Ademais, os níveis de expressão de 20P1F12/TMPRSS2 nos xenoenxertos LAPC-4 e LAPC-9 também foram examinados por análise de Northern blot. Os resultados, mostrados na Fig. 6 (Painel C), indicam níveis de expressão similares nos xenoenxertos e tecido normal, com expressão de nível inferior visto no xenoenxerto LAPC-9 somente. Análise de Northern blot adicional da expressão de 20P1F12/TMPRSS2 num painel maior de células de cancro é descrita no Exemplo 4, a seguir.

EXEMPLO 3: CLONAGEM DE COMPRIMENTO COMPLETO DE ADNC DE 20P1F12

Um ADNC de comprimento completo que codifica o gene 20P1F12/TMPRSS2 foi isolado de uma biblioteca próstata humana e designado 20P1F12-GTC1. As sequências de nucleótidos e de aminoácidos de 20P1F12-GTC1 são mostradas na FIG 1. O plasmídeo p20P1F12-GTC1 (portando o ADNC de 20P1F12-GTC1) foi depositado no ATCC (Manassas, Virginia) em 12 de Fevereiro de 1999 e foi registado com o Número de Designação do ATCC 207097. O ADNC de 20P1F12-GTC1 de aproximadamente 3,5 kb codifica uma proteína de 492 aminoácidos que é quase, mas não completamente, idêntica à sequência anteriormente descrita (FIG. 2). Existem diversas diferenças na sequência de nucleótidos do ADNC de 20P1F12-GTC1 em relação a sequência de TMPRSS2 publicada, cinco dos quais resultam em aminoácidos codificados diferentes, como mostrado no alinhamento de aminoácidos da FIG. 3. Especificamente, quatro das diferenças de aminoácido são no domínio da protease, três das quais são diferenças de

aminoácido não conservadoras que poderiam afectar a função e/ou especificidade da protease. Não está claro como estas diferenças na sequência de aminoácidos poderiam afectar a actividade biológica. Contudo, é possível que 20P1F12/TMPRSS2 e TMPRSS2 sejam expressos de maneira diferencial em vista dos dados dos depositantes que mostram padrão de expressão de ARNm divergente em tecidos humanos normais.

EXEMPLO 4: EXPRESSÃO DE 20P1F12/TMPRSS2 EM CANCRO DA PRÓSTATA E DO CÓLON

Para analisar a expressão de 20P1F12/TMPRSS2 em linhas celulares e tecidos de cancro, Northern blotting foi realizado em derivado de ARN dos xenoenxertos LAPC e um painel de linhas celulares de cancro da próstata e não da próstata. Os resultados mostram altos níveis de expressão de 20P1F12/TMPRSS2 em todos os xenoenxertos LAPC e em linhas celulares de cancro do cólon (FIG. 7). Níveis de expressão similares foram detectados em próstata, LAPC-4 AD, LAPC-4 Al, LAPC-9 AD e LNCaP. Níveis inferiores de 20P1F12/TMPRSS2 foram vistos em células LAPC-9 Al e PC-3 sem expressão vista em DU145. Altos níveis de expressão de 20P1F12/TMPRSS2 também foram detectados em três das quatro linhas celulares de cancro do cólon, que incluem LoVo, T84 e Colo-205.

EXEMPLO 5: CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNA 20P1F12/TMPRSS2

Geração de Anticorpos monoclonais de 20P1F12/TMPRSS2

TMPRSS2 representa um alvo terapêutico potencial para cancros da próstata e do cólon. Como um antigénio de superfície celular, pode ser um particularmente bom alvo para terapêutica com anticorpo. Para explorar esta possibilidade e caracterizar adicionalmente a proteína 20P1F12/TMPRSS2, anticorpos monoclonais dirigidos contra uma proteína de fusão de GST-20P1F12/TMPRSS2 foram gerados. O imunogénio compreendia uma região de aproximadamente 8 kD dentro do domínio da protease, especificamente os resíduos

de aminoácido 362 a 440 (veja-se a FIG. 1). Ratinhos foram imunizados com GST-TMPRSS2 purificado e foram gerados hibridomas. Os sobrenadantes de hibridomas foram seleccionados para anticorpos específicos por meio de western blotting utilizando lisados de células 293T transfectadas com 20P1F12/TMPRSS2. Um total de 6 hibridomas foram identificados que especificamente reconhecem 20P1F12/TMPRSS2 por Western blotting (FIG. 8a).

Western blotting de lisados de células LNCaP, LAPC-4 e LAPC-9 identifica duas bandas de proteínas principais de aproximadamente 70 e 32 kilodaltons (kD) (FIG. 8b). O peso molecular (MW) predito de 20P1F12/TMPRSS2 é de 54 kD, sugerindo que a isoforma de 70 kD é modificada, possivelmente por glicosilação. A forma de 32 kD pode ser um fragmento proteoliticamente clivado que contém os epítopos carboxilo terminais reconhecidos pelos anticorpos.

mAb de 20P1F12/TMPRSS2 adicionais podem ser gerados por meio de imunização a base de célula utilizando células LAPC-9 e células PC-3 que expressam 20P1F12/TMPRSS2 como um agente de selecção para ELISA baseado em célula. Ademais, mAbs de 20P1F12/TMPRSS2 podem ser gerados utilizando proteína de 20P1F12/TMPRSS2 purificada como imunogénio. Por exemplo, 20P1F12/TMPRSS2 recombinante que tem uma cauda de histidina amino-terminal pode ser expresso num sistema de baculovírus utilizando pBlueBac4.5 (Invitrogen). 20P1F12/TMPRSS2 com cauda de histidina então pode ser purificada utilizando uma coluna de níquel, quantificada e utilizada como imunogénio. A selecção de monoclonal pode ser realizada utilizando ELISA baseados em células com, por exemplo, células LNCaP e PC-3/TMPRSS2.

Localização de superfície celular

Para estudar as características da proteína 20P1F12/TMPRSS2, ADNc de 20P1F12 (FIG. 1) foi克隆ado em ADNpc 3.1 Myc-His (Invitrogen), que proporciona uma etiqueta 6-His na terminação carboxilo. O constructo foi

transfetado em células 293T e foi analisado por meio de biotinilação de superfície celular. As proteínas de superfície celular biotiniladas foram purificadas por afinidade utilizando estreptavidina-sefarose. A análise de Western blot de proteínas purificadas por afinidade com estreptavidina utilizando um anticorpo anti-His demonstrou a presença de proteína 20P1F12/TMPRSS2 (FIG. 9a). Portanto, como predito a partir da análise de sequência, 20P1F12/TMPRSS2 é expressa na superfície celular de células transfetadas.

Para examinar a expressão em superfície celular de 20P1F12/TMPRSS2 endógena em células de cancro da próstata LNCaP e PC-3, proteínas de superfície celular biotiniladas foram purificadas por afinidade com estreptavidina-sefarose e sondadas com anticorpos anti-20P1F12/TMPRSS2. Western blotting de proteínas purificadas com estreptavidina claramente mostra biotinilação de superfície celular de 20P1F12/TMPRSS2 endógena tanto em células LNCaP como PC-3 aparecendo como bandas de proteína de 32 e 70 kD (FIG. 9b). Em controlos adicionais, a proteína 20P1F12/TMPRSS2 não foi detectada em precipitados de estreptavidina de células não biotiniladas (Fig. 8b). Este dado combinado com a análise de sequência prediz que 20P1F12/TMPRSS2 seja uma proteína transmembranar de tipo II.

De maneira interessante, células 293T transfetadas com uma 20P1F12/TMPRSS2 com cauda de histidina carboxilo terminal expressa primariamente a proteína de 70 kD (FIG. 9a). Uma vez que o domínio de protease de 20P1F12/TMPRSS2 localiza-se na terminação carboxilo, é possível que o fragmento de 32 kD seja um resultado de clivagem autocatalítica, que é inibida pela cauda de histidina. A molécula relacionada, hepsina (TMPRSS1), parece que é capaz de autoactivação numa maneira dependente de concentração (Vu *et al.*, 1997, J. Biol. Chem. 272: 31315-31320). Esta clivagem autocatalítica pode ser explorada para identificar

moléculas pequenas que inibem a actividade de 20P1F12/TMPRSS2. As células podem ser crescidas na presença ou ausência de inibidores de molécula pequenas para procurar especificamente a inibição de clivagem. Tais moléculas pequenas podem ser testadas como terapêutica para cancro da próstata.

Glicosilação de 20P1F12/TMPRSS2

O MW predito de 20P1F12/TMPRSS2 é significativamente menor que o MW aparente detectado por Western blotting. Isto sugere que 20P1F12/TMPRSS2 pode ser glicosilada. A sequência GTC1 indica que existem três sítios de glicosilação potenciais com a sequência consenso de NXS/T (resíduos 128, 213, 249). Para explorar a possibilidade de que 20P1F12/TMPRSS2 seja glicosilada, 20P1F12/TMPRSS2 com cauda de histidina foi transfetada em células 293T e purificada utilizando um níquel-agarose (Invitrogen). A proteína purificada por afinidade foi eluída com EDTA 50 mM, pH 8,0, e foi desglicosilada utilizando N-glicosidase F (Boehringer Mannheim) de acordo com o protocolo do fabricante. Proteínas não tratadas e desglicosiladas foram analisadas por western blotting utilizando anti-His anticorpos. Os resultados mostram um desvio de MW de 5-8 kD de 20P1F12/TMPRSS2 com tratamento com N-glicosidase F (FIG 10), indicando que 20P1F12/TMPRSS2 é de facto uma proteína glicosilada. 20P1F12/TMPRSS2 desglicosilada ainda exibia um MW de pelo menos 5-10 kD maior que o tamanho predito, indicando que ou a reacção de desglicosilação não foi completa (ou que a glicosilação é O-ligada), ou que 20P1F12/TMPRSS2 pode exibir modificações pós-traducionais adicionais (tais como fosforilação, sulfatação).

Regulação de Androgénio

Northern blotting mostra que a expressão de 20P1F12/TMPRSS2 parece diminuir no xenoenxerto LAPC-9 independente de androgénio e as linhas celulares PC-3 e DU145 independente de androgénio (FIG. 6), sugerindo que

20P1F12/TMPRSS2 pode ser um gene regulado por androgénio. Para explorar esta possibilidade, células LNCaP, que são dependentes de androgénio e expressam níveis significativos de 20P1F12/TMPRSS2, foram privadas de androgénio durante uma semana crescendo-as em meio que continha soro fetal bovino pré-tratado com carvão activado a 2% (FBS). As células então foram estimuladas com mibolerona, um análogo de androgénio sintético, em vários pontos de tempo. Células foram recolhidas para ARN e Northern blotting. Como um controlo de carga, a mesma mancha também foi sondada com β -actina. Os resultados (FIG. 11) mostram uma clara redução de expressão de 20P1F12/TMPRSS2 durante a privação de androgénio (FIG. 11). A adição de mibolerona aumentou a expressão de 20P1F12/TMPRSS2 significativamente, indicando que é um gene que responde a androgénio. A expressão de antígeno específico da próstata (PSA) nas mesmas amostras foi monitorizada como um controlo positivo para regulação de androgénio (FIG. 11).

Para determinar o tempo óptimo de indução de 20P1F12/TMPRSS2, células privadas de androgénio foram estimuladas com mibolerona por vários pontos de tempo. As células foram recolhidas para isolamento de ARN e proteína para realizar northern e western blotting respectivamente. Os resultados (FIG. 12) mostram indução de mensagem de 20P1F12/TMPRSS2 dentro de três horas de estimulação e aumentou ao longo de 24 horas após a adição de hormona.

Para analisar os níveis de proteína, foi realizado western blotting de lisados celulares utilizando o mAb 1 F9. Controlos adicionais para a expressão de 20P1F12/TMPRSS2 incluíram células PC-3 infectadas com um retrovírus que codifica ou neo ou 20P1F12/TMPRSS2. As células PC-3 infectadas foram seleccionadas em G418 durante 2-3 semanas e recolhidas para western blotting. Os resultados mostraram forte expressão de 20P1F12/TMPRSS2 nas

células infectadas com um vírus 20P1F12/TMPRSS2, e não detectou-se expressão de 20P1F12/TMPRSS2 nas células neo.

Quando examina-se células LNCaP privadas de androgénio, a expressão de 20P1F12/TMPRSS2 ainda é detectável, mas visivelmente reduzida quando se compara com células estimuladas com androgénio. Contudo, o primeiro ponto de tempo da expressão induzida aparece após 9 horas de estímulo, indicando que a expressão de proteína de 20P1F12/TMPRSS2 decai a indução de ARN (FIG. 12).

Estes resultados demonstram que 20P1F12/TMPRSS2 é um gene regulado por androgénio, similar a outras proteases específicas de próstata, tais como PSA e hK2 (Young *et al.*, 1995, J. Androl. 16:97).

Efeito de 20P1F12/TMPRSS2 sobre a morfologia de NIH 3T3

20P1F12/TMPRSS2 exibe expressão específica de próstata e parece que é regulado por androgénio. Para determinar o efeito da expressão de 20P1F12/TMPRSS2 numa linha celular não de cancro da próstata heteróloga, retrovírus de 20P1F12/TMPRSS2 foi utilizada para infectar células NIH 3T3. A morfologia das células infectada com retrovírus 20P1F12/TMPRSS2 foi comparada com a morfologia de células infectadas com vírus de controlo (neo). Uma população de células infectadas exibiu uma aparência vacuolar distinta em comparação com células de controlo (FIG. 13), que parecem estar correlacionadas com altos níveis de expressão. Após a passagem desta população de células infectadas, células que portavam vacúolos gradualmente desapareceram com expressão aparentemente reduzida de 20P1F12/TMPRSS2.

Avaliação da Função de 20P1F12/TMPRSS2

A função de 20P1F12/TMPRSS2 pode ser avaliada em células de mamíferos modificadas por engenharia para expressar 20P1F12/TMPRSS2. Para este propósito, 20P1F12/TMPRSS2 é convenientemente clonada em diversos vectores, que incluem ADNpc 3.1 myc-His-tag (Invitrogen), o

retrovírus viral pSR_αtkneo (Muller et al., 1991, MCB 11:1785), e pIND (Invitrogen) um sistema de expressão induzível por ecdisona. Utilizando estes vectores de expressão, 20P1F12/TMPRSS2 é expressa em diversas linhas celulares, que incluem PC-3, NIH 3T3, fibroblastos de célula L de rato e 293T. A expressão de 20P1F12/TMPRSS2 é monitorizada utilizando anticorpos anti-20P1F12/TMPRSS2 por análise de Western e FACS. TMPRSS2 purificada pode ser utilizada para identificar o substrato.

Tais linhas celulares de mamíferos que expressam 20P1F12/TMPRSS2 são então testadas em diversos *in vitro*, que incluem proliferação celular, adesão celular, invasão celular utilizando um sistema de cultura de invasão membrana (MICS) (Welch et al., Int. J. Cancer 43: 449-457) em cultura de tecido, e ensaios *in vivo*, que incluem a formação de tumor em ratinhos SCID. O fenótipo celular de 20P1F12/TMPRSS2 é comparado com o fenótipo de células que não expressam 20P1F12/TMPRSS2.

Para avaliar o papel funcional dos diferentes domínios em 20P1F12/TMPRSS2, os seguintes mutantes com deleção e mutantes pontuais são gerados: (i) ΔSRCR (deleção de 93 a.a.); (ii) ΔLDLRA (deleção de 35 a.a.); e (iii) mutante da triade catalítica: H296Q, D345N, S441A (mutantes de pontos individuais). Os mutantes 20P1F12/TMPRSS2 são clonados nos vectores retrovirais psR_αtkneo para expressão em células de mamíferos. Os mutantes resultantes são úteis para elucidar a importância dos diferentes domínios e resíduos. Ademais, estas experiências são úteis para determinar se tais mutantes funcionam como moléculas dominantes negativas. A actividade dominante negativa pode ser manifestada em células que expressa 20P1F12/TMPRSS2 endógena, tais como LNCaP. A actividade dominante negativa pode ser devido a interacções com substratos via domínio de protease, ou via os domínios de interacção proteína-proteína. As moléculas 20P1F12/TMPRSS2 mutantes são testadas nos mesmos ensaios *in*

vitro e *in vivo* como 20P1F12/TMPRSS2 de tipo selvagem (veja-se anteriormente). Tais moléculas 20P1F12/TMPRSS2 dominantes negativas podem ser úteis terapeuticamente. Por exemplo, uma 20P1F12/TMPRSS2 dominante negativa pode ser introduzida em células cancro da próstata via vectores de terapêutica genica capazes de distribuir e expressar a sequência codificante correspondente em células de tumor da próstata. De maneira similar, tais métodos pode ser úteis no tratamento de cancro do cólon.

A determinação de características da expressão de 20P1F12/TMPRSS2 em tecidos de ratinhos normais e em ratinhos transgénicos proporciona informação adicional a respeito da função de 20P1F12/TMPRSS2. A análise Northern blot utilizando sondas desenhadas a partir de sequências 20P1F12/TMPRSS2 proporcionadas no presente documento pode ser utilizada para definir o padrão de expressão de 20P1F12/TMPRSS2 murina. Ademais, a expressão de 20P1F12/TMPRSS2 durante desenvolvimento no embrião de rato pode ser analisada. Os dados resultantes identificarão uma fonte de tecido para clonagem do gene de rato e predizer quais tecidos seriam afectados num estudo de rato transgénico silenciado.

Rato transgénico pode ser gerado e utilizado para definir o papel biológico de 20P1F12/TMPRSS2 num ajuste *in vivo*. Numa abordagem, o gene humano ou de rato de 20P1F12/TMPRSS2s são utilizados para gerar ratinhos transgénicos. A sobre-expressão de formação de tumor espontânea em ratinhos pode ser estudada utilizando ratinhos transgénicos. Noutra abordagem, o silenciamento génico de 20P1F12/TMPRSS2 é gerado em ratinhos. Tais ratinhos também podem ser cruzados com outros modelos de rato de cancro da próstata, tais como o modelo TRAMP (Greenberg et al., 1995, PNAS 92:3439) para estudar a influência sobre a agressividade e metástase do cancro da próstata e para observar mudanças na progressão da doença.

Experiências testando a interacção funcional de 20P1F12/TMPRSS2 com inibidores de serina protease também proporcionarão informação sobre a função de 20P1F12/TMPRSS2. para este propósito, a inibição é conseguida utilizando moléculas de baixo peso molecular como inibidores ou inibidores biológicos.

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- WO 9824893 A, Jakobovits [0048]
- WO 9816628 A, Sawyers [0058]

Literatura não relacionada com patentes referida na descrição

- **Lalani et al.** Cancer Metastasis Rev., 1997, vol. 16, 29-66 [0003]
- **Gao et al.** Prostate, 1997, vol. 31, 264-281 [0004]
- **Cupp; Osterling.** Mayo Clin Proc, 1993, vol. 68, 297-306 [0005]
- **Israeli et al.** Cancer Res, 1993, vol. 53, 227-230 [0006]
- **Sodee et al.** Clin Nuc Med, 1996, vol. 21, 759-766 [0006]
- **Reiter et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, vol. 95, 1735-1740 [0007]
- **Horoszewicz et al.** Cancer Res., 1983, vol. 43, 1809 [0008]
- **Pretlow et al.** Cancer Res., 1991, vol. 51, 3814 [0008]
- **van Weerden et al.** Am. J. Pathol., 1996, vol. 149, 1055 [0008]
- **Klein et al.** Nature Med., 1997, vol. 3, 402 [0008]
- **Kaighn et al.** Invest. Urol., 1979, vol. 17, 16-23 [0008]
- **Gleave et al.** Cancer Res., 1992, vol. 52, 1598-1605 [0008]
- **Klein et al.** Nature Med., vol. 3, 402 [0009]
- **Paoloni-Giacobino et al.** Genomics, 1997, vol. 44, 309-320 [0010] [0017] [0018] [0105]

- **Henriet et al.** APMIS, 1999, vol. 107 (1), 111-9 [0019]
- **Rochefort et al.** APMIS, 1999, vol. 107 (1), 86-95 [0019]
- **Webber et al.** Clin Cancer Res, 1995, vol. 1 (10), 1089-94 [0019]
- **Duffy.** Clin Cancer Res, 1996, vol. 2 (4), 613-8 [0019]
- **Webber; Waghray.** Clin Cancer Res, 1995, vol. 1 (7), 755-61 [0019]
- **Whitney et al.** J Biol Chem, 1995, vol. 270, 18187 [0020]
- **Luo et al.** J Immunol, 1992, vol. 148, 1630 [0020]
- **Yamamura et al.** Biochem Biophys Res Commun, 1997, vol. 239, 386 [0020]
- **Leyus et al.** Biochemistry, 1988, vol. 27, 1067-74 [0021]
- **Tanimoto et al.** Cancer Res., 1997, vol. 57, 2884-2887 [0021]
- **Muller et al.** MCB, 1991, vol. 11, 1785 [0034]
- **Arthur et al.** Cancer Gene Ther., 1997, vol. 4, 17-25 [0067]
- **Henderson et al.** Cancer Res., 1996, vol. 56, 3763-3770 [0067]
- **Ribas et al.** Cancer Res., 1997, vol. 57, 2865-2869 [0067]
- **Ashley et al.** J. Exp. Med., 1997, vol. 186, 1177-1182 [0067]
- **Wagner et al.** Hybridoma, 1997, vol. 16, 33-40 [0068]
- **Foon et al.** J Clin Invest, 1995, vol. 96, 334-342 [0068]
- **Herlyn et al.** Cancer Immunol Immunother, 1996, vol. 43, 65-76 [0068]
- Antibodies: A Laboratory Manual. CSH Press, 1988 [0043]
- **Harlow.** Antibodies. Cold Spring Harbor Press, 1989 [0043]
- **Vaughan et al.** Nature Biotechnology, 1998, vol. 16, 535-539 [0047]
- Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications. Nottingham Academic, 1993, 45-64 [0048]
- **Burton; Barbas.** Human Antibodies from combinatorial libraries, 65-82 [0048]

- **Kucherlapati; Jakobovits.** Exp. Opin. Invest. Drugs, 1998, vol. 7 (4), 607-614 [0048]
- Immunotoxin therapy. **Vitetta, E.S. et al.** Cancer: Principles and Practice of Oncology. J.B. Lippincott Co, 1993, 2624-2636 [0050]
- **Arlen et al.** Crit Rev Immunol, 1998, vol. 18, 133-138 [0053]
- **Ozaki et al.** Blood, 1997, vol. 90, 3179-3186 [0053]
- **Tsunenari et al.** Blood, 1997, vol. 90, 2437-2444 [0053]
- **Kasprzyk et al.** Cancer Res, 1992, vol. 52, 2771-2776 [0053]
- **Funakoshi et al.** J Immunther Emphasis Tumor Immunol, 1996, vol. 19, 93-101 [0053]
- **Zhong et al.** Leuk Res, 1996, vol. 20, 581-589 [0053]
- **Moun et al.** Cancer Res, 1994, vol. 54, 6160-6166 [0053]
- **Velders et al.** Cancer Res, 1995, vol. 55, 4398-4403 [0053]
- **Shepard et al.** J Clin Immunol, 1991, vol. 11, 117-127 [0053]
- **Klein et al.** Nature Medicine, 1997, vol. 3, 402-408 [0058]
- **Hodge et al.** Int. J. Cancer, 1995, vol. 63, 231-237 [0065]
- **Fong et al.** J. Immunol., 1997, vol. 159, 3113-3117 [0065]
- **Restifo.** Curr. Opin. Immunol., 1996, vol. 8, 658-663 [0066]
- **Tjoa et al.** Prostate, 1996, vol. 28, 65-69 [0067]
- **Murphy et al.** Prostate, 1996, vol. 29, 371-380 [0067]
- **Verkaik et al.** Urol. Res., 1997, vol. 25, 373-384 [0077]
- **Ghossein et al.** J. Clin. Oncol., 1995, vol. 13, 1195-2000 [0077]
- **Heston et al.** Clin. Chem., 1995, vol. 41, 1687-1688 [0077]
- **Racila et al.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, vol. 95, 4589-4594 [0078]

- **Vu et al.** J. Biol. Chem., 1997, vol. 272, 31315-31320 [0115]
- **Young et al.** J. Androl., 1995, vol. 16, 97 [0121]
- **Welch et al.** Int. J. Cancer, vol. 43, 449-457 [0124]
- **Greenberg et al.** PNAS, 1995, vol. 92, 3439 [0127]

REIVINDICAÇÕES

- 1.** Uma proteína 20P1F12/TMPRSS2 isolada que comprehende a sequência de aminoácidos mostrada na Fig. 1.
- 2.** Um polinucleótido isolado seleccionado de (a) um polinucleótido que tem a sequência de nucleótidos como mostrado na Fig. 1, em que T pode também ser U; (b) um polinucleótido que codifica um polipéptido 20P1F12/TMPRSS2 cuja sequência é codificada pelo ADNC contido no plasmídeo p20P1F12-GTC1 como depositado na American Type Culture Collection com n.º de acesso 207097; e (c) um polinucleótido que codifica a proteína 20P1F12/TMPRSS2 da Fig. 1.
- 3.** Um vector de expressão recombinante que contém um polinucleótido de acordo com reivindicação 2.
- 4.** O vector de expressão de acordo com a reivindicação 3, em que o vector é o plasmídeo p20P1F12-GTC1 como depositado na American Type Culture Collection com n.º de acesso 207097.
- 5.** O vector de expressão de acordo com a reivindicação 3, em que o vector é um vector viral.
- 6.** O vector de expressão de acordo com a reivindicação 5, em que o vector viral é seleccionado de vírus vaccinia, vírus da varíola aviária, vírus canarypox, adenovírus, vírus influenza, poliovírus, vírus adeno-associado, lentivírus e vírus Sindbis.
- 7.** Uma célula hospedeira que contém um vector de expressão de acordo com qualquer uma das reivindicações 3 a 6.

8. Um ensaio para determinar a presença de cancro da próstata ou do cólon num indivíduo, que compreende colocar em contacto uma amostra de teste de tecido da próstata ou do cólon com um anticorpo que se liga imunoespecificamente à proteína que consiste na sequência de aminoácidos da Fig. 1, e cujo anticorpo é marcado com um marcador detectável, e detectar a ligação da proteína 20P1F12/TMPRSS2 na amostra ao mesmo, em que um aumento significativo na expressão da proteína 20P1F12/TMPRSS2 na amostra de tecido de teste em relação a níveis de expressão no correspondente tecido normal indica a presença de cancro da próstata ou do cólon.

9. Um ensaio para determinar a presença de cancro da próstata ou do cólon num indivíduo, que compreende:

- (a) colocar em contacto uma amostra de tecido da próstata ou do cólon com uma sonda polinucleotídica que hibrida especificamente com o polinucleótido da Fig. 1; e
- (b) detectar a presença de um complexo de hibridação formado pela hibridação da sonda com o polinucleótido de 20P1F12/TMPRSS2 na amostra, em que a presença do complexo de hibridação indica a presença de polinucleótido 20P1F12/TMPRSS2 na amostra, em que um aumento significativo em polinucleótido 20P1F12/TMPRSS2 na amostra em relação a níveis num correspondente tecido normal indica a presença de cancro.

10. Um ensaio para determinar a presença de cancro da próstata ou do cólon num indivíduo, que compreende:

- (a) produzir ADNC a partir de uma amostra de tecido da próstata ou do cólon por transcrição reversa utilizando pelo menos um iniciador;
- (b) amplificar o ADNC assim produzido pela utilização de iniciadores *sense* e *anti-sense* para amplificar ADNC de 20P1F12/TMPRSS2 no mesmo; e

(c) detectar a presença do ADNc de 20P1F12/TMPRSS2 amplificado,

em que os iniciadores *sense* e *anti-sense* são capazes de amplificar o polinucleótido da Fig. 1, e em que um aumento significativo em ADNc ou ARNm de 20P1F12/TMPRSS2 na amostra de tecido de teste em relação a níveis num correspondente tecido normal indica a presença de cancro da próstata ou do cólon.

11. Um ensaio de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 10, em que o cancro é cancro da próstata.

12. Um anticorpo ou fragmento de ligação a抗igénio do mesmo que se liga imunoespecificamente à proteína que consiste na sequência de aminoácidos da Fig. 1, para utilização num método para o tratamento de cancro da próstata.

13. Um anticorpo ou fragmentos de ligação a抗igénio de acordo com a reivindicação 12 conjugado a uma toxina ou agente terapêutico para utilização num método para o tratamento de cancro da próstata.

14. Utilização de um anticorpo ou fragmento de ligação a抗igénio do mesmo que se liga imunoespecificamente à proteína que consiste na sequência de aminoácidos da Fig. 1, para o fabrico de um medicamento para o tratamento de cancro da próstata.

15. Utilização de acordo com reivindicação 14, em que o anticorpo ou fragmento do mesmo é conjugado a uma toxina ou agente terapêutico.

FIG 1

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

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

 119 128 137 146 155 164
 AAG ATG GCT TTG AAC TCA GGG TCA CCA CCT GCT ATT GGA CCT TAC TAT GAA AAC

 M A L N S G S P P A I G P Y Y E N
 173 182 191 200 209 218
 CAT GGA TAC CAA CCG GAA AAC CCC TAT CCC GCA CAG CCC ACT GTG GTC CCC ACT

 R G Y Q P E N P Y P A Q P T V V V P T
 227 236 245 254 263 272
 GTC TAC GAG GTG CAT CCG GCT CAG TAC TAC CCG TCC CCC GTG CCC CAG TAC GCC

 V Y E V H P A Q Y Y P S P V V P Q Y A
 281 290 299 308 317 326
 CCG AGG GTC CTG ACG CAG GCT TCC AAC CCC GTC GTC TGC ACG CAG CCC AAA TCC

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

 P S G T V C T S K T K K A L C I T L
 389 398 407 416 425 434
 ACC CTG GGG ACC TTC CTC GTG GGA GCT GCG CTG GCC GCT GGC CTA CTC TGG AAG

 T L G T F L V G A A L A A G L L W K
 443 452 461 470 479 488
 TTC ATG GGC AGC AAG TGC TCC AAC TCT GGG ATA GAG TGC GAC TCC TCA GGT ACC

 F M G S K C S N S G I E C D S S G T
 497 506 515 524 533 542
 TGC ATC AAC CCC TCT AAC TGG TGT GAT GGC GTG TCA CAC TGC CCC GGC GGG GAG

 C I N P S N W C D G V S H C P G G E
 551 560 569 578 587 596
 GAC GAG AAT CGG TGT GTT CGC CTC TAC GGA CCA AAC TTC ATC CTT CAG GTG TAC

 D E N R C V R L Y G P N F I L Q V Y
 605 614 623 632 641 650
 TCA TCT CAG AGG AAG TCC TGG CAC CCT GTG TGC CAA GAC GAC TGG AAC GAG AAC

 S S Q R K S W H P V C Q D D D W N E N
 659 668 677 686 695 704
 TAC GGG CGG GCG GCC TGC AGG GAC ATG GGC TAT AAG AAT AAT TTT TAC TCT AGC

 Y G R A A C R D M G Y K N N F Y S S

713	722	731	740	749	758
CAA GGA ATA GTG GAT GAC AGC GGA TCC ACC AGC TTT ATG AAA CTG AAC ACA AGT					
- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Q G I V D D S G S T S F M K L N T S					
767	776	785	794	803	812
GCC GGC AAT GTC GAT ATC TAT AAA AAA CTG TAC CAC AGT GAT GCC TGT TCT TCA					
- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
A G N V D I Y K K L Y H S D A C S S					
821	830	839	848	857	866
AAA GCA GTG GTT TCT TTA CGC TGT ATA GCC TGC GGG GTC AAC TTG AAC TCA AGC					
- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
K A V V S L R C I A C G V N L N S S					
875	884	893	902	911	920
CGC CAG AGC AGG ATT GTG GGC GGC GAG AGC GCG CTC CCG GGG GCC TGG CCC TGG					
- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
R Q S R I V G G E S A L P G A W P W					
929	938	947	956	965	974
CAG GTC AGC CTG CAC GTC CAG AAC GTC CAC GTG TGC GGA GGC TCC ATC ATC ACC					
- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Q V S L H V Q N V H V C G G S I I T					
983	992	1001	1010	1019	1028
CCC GAG TGG ATC GTG ACA GCC GCC CAC TGC GTG GAA AAA CCT CTT AAC AAT CCA					
- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
P E W I V T A A H C V E K P L N N P					
1037	1046	1055	1064	1073	1082
TGG CAT TGG ACG GCA TTT GCG GGG ATT TTG AGA CAA TCT TTC ATG TTC TAT GGA					
- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
W H W T A F A G I L R Q S F M F Y G					
1091	1100	1109	1118	1127	1136
GCC GGA TAC CAA GTA GAA AAA GTG ATT TCT CAT CCA AAT TAT GAC TCC AAG ACC					
- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
A G Y Q V E K V I S H P N Y D S K T					
1145	1154	1163	1172	1181	1190
AAG AAC AAT GAC ATT GCG CTG ATG AAG CTG CAG AAG CCT CTG ACT TTC AAC GAC					
- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
K N N D I A L M K L Q K P L T F N D					
1199	1208	1217	1226	1235	1244
CTA GTG AAA CCA GTG TGT CTG CCC AAC CCA GGC ATG ATG CTG CAG CCA GAA CAG					
- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
L V K P V C L P N P G M M L Q P E Q					
1253	1262	1271	1280	1289	1298
CTC TGC TGG ATT TCC GGG TGG GGG GCC ACC GAG GAG AAA GGG AAG ACC TCA GAA					
- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
L C W I S G W G A T E E K G K T S E					
1307	1316	1325	1334	1343	1352
GTG CTG AAC GCT GCC AAG GTG CTT CTC ATT GAG ACA CAG AGA TGC AAC AGC AGA					
- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
V L N A A K V L L I E T Q R C N S R					
1361	1370	1379	1388	1397	1406
TAT GTC TAT GAC AAC CTG ATC ACA CCA GCC ATG ATC TGT GGC GGC TTC CTG CAG					
- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
Y V Y D N L I T P A M I C A G F L Q					

1415	1424	1433	1442	1451	1460
GGG AAC GTC GAT TCT TGC CAG GGT GAC AGT GGA GGG CCT CTG GTC ACT TCG AAG					
- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
G	N	V	D	S	C
Q	G		D	S	G
				G	P
				L	V
				T	S
					K

1469	1478	1487	1496	1505	1514
AAC AAT ATC TGG TGG CTG ATA GGG GAT ACA AGC TGG GGT TCT GGC TGT GCC AAA					
- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
N	N	I	W	W	L
I	G		D	T	S
				W	G
				S	G
				C	A
					X

1523	1532	1541	1550	1559	1568
GCT TAC AGA CCA GGA GTG TAC GGG AAT GTG ATG GTA TTC ACG GAC TGG ATT TAT					
- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
A	Y	R	P	G	V
				Y	G
				N	V
				M	V
				F	T
				D	W
				I	Y

1577	1586	1595	1604	1613	1622
CGA CAA ATG AGG GCA GAC GGC TAA TCC ACA TGG TCT TCG TCC TTG ACG TCG TTT					
- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
R	Q	M	R	A	D
				G	*

1631	1640	1649	1658	1667	1676
TAC AAG AAA ACA ATG GGG CTG GTT TTG CTT CCC CGT GCA TGA TTT ACT CTT AGA					
- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -
1685	1694	1703	1712	1721	1730
GAT GAT TCA GAG GTC ACT TCA TTT TTA AAC AGT GAA CTT GTC TGG CAA AAA					
- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -

1739					
AAA AAA AAA A 3'					

FIG 2

1 gtcatattga acatccaga taccttatcat tactcgatgc tggtgataac agccaatgg
61 ctttgaactc agggtcacca ccagctattg gaccttacta tgaaaaccat ggataccaaac
121 cgaaaaaccc ctatcccgca cagccccactg tggtccccac tgtctacgag gtgcacccgg
181 ctcagtacta cccgtcccccc gtcccccaagt acggccccgag ggtcttgacg caggettccca
241 accccgtcggt ctgcacccgag cccaaatccc catccggac agtgtgcacc tcaaagacta
301 agaaaagact gtgcacccatcc ttgacccctgg ggaccttccct cgtgggagct gcgcgtggccg
361 ctggccact ctggaaagttt atgggcacca agtgcctccat ctctgggata gagtgccgact
421 ctcaggatct ctgcacccatcaac cccctcaact ggtgtgatgg cgtgtcacac tggcccccgg
481 gggaggacga aatcggtgtt gttcccttccct acggacccaaa cttcatccctt cagatgtact
541 catctcagag gaagtccctgg caccctgtgtt gccaagacga ctggaaacgag aactacggc
601 gggccggctg cagggacatg ggctataaga ataattttta tcctggccaa ggaatagtgg
661 atgacagccg atccaccacgc tttatgaaaac tgaacacaag tggccggcaat gtcgatataat
721 ataaaaaaact gtaccacacgt gatgcctgtt cttccaaaaggc agtggtttct tracgctgtt
781 tagctgcgg ggtcaacttg aactcaaggc gccagagcag gatcgctggc ggtgagagcg
841 cgctcccccggg ggcctggccc tggcagggtca gcttcacqtc ccagaacacgtc cacgtgtcg
901 gaggtcccat catcacecccc gagtggatcg tgacagccgc ccactgcgrg gaaaaaaccc
961 ttaacaatcc atggcattgg acggcatttgc cggggattttt gagacaatct ttcatgttt
1021 atggagccgg ataccaatgt caaaaagtgtt tttctcatcc aaattatgac tccaagacca
1081 agaacaatgt cattgcgtt atgaagcttc gacttcaac gacctagtgt
1141 aaccagggtgt tggcccaac ccaggcatgt tgctgcagcc agaacagctc tgctggattt
1201 ccgggtgggg gggccaccggag gagaaggaa agacccatgtt aatggggatcc
1261 tgcttcctcat tgagacacagc agatgcaaca gcatatgtt ctatgacaac ctgtatcacac
1321 cagccatgtat ctgtgcggc ttcctgcagg ggaacgtcga ttctggccag ggtgacagtg
1381 gagggtccctt ggtcacttcg aacaacaataat tctgggtgtt gataggggat caaaagctgg
1441 gttctggctg tgccaaatgt tacagaccag gatgttacgg gaaatgtatgatgtt
1501 actggatata tccacaaatgt aaggccaaacg gctaattccac aaggcttcccg tcccttgacgg
1561 cgttttacaa gaaaacaatgt ggggtggttt tgcttcccccg tgcattttttt actcttttagag
1621 atgattcaga ggtcaacttca ttttttattaa acatgttactt tgcttgggtt tggcaacttcc
1681 tgccataactg tgcagggttgc agtgggtccctt ctggccccagcc tgcattttccctt aacccctttt
1741 ccgaaggggg tgatggccgg tgggttggg gcaactggccgg tcaattgtgg zaaaaagagg
1801 gttggggctt gccccccattt gatgttccctt gtcagggggc caatttttgg
1861 tgagcatggg ggttcaactt ctcaatgtt ggttgcactt agatggaaaaa ggagagacat
1921 gggaaaggggag acagccaggat ggcacccatgtt gggccgtggcc tctggggccca ttttttttt
1981 tccccccatgtt acatccacaaatgt gggattttgc tgatgggttca ttagagccctt agcggccctt
2041 gatgttggcc agaaataaaatg ggacccaggcc ttcattgggtt gtcagggtt gatgttccctt
2101 aaggggaaaca gaaaattttgc tttttttttt ggggtggaaat atagacacttgc cccttgggtgc
2161 gagggaaaca attggaaaagg aacttgcctt gacacttgc ggtcagggtt tccacccatgt
2221 catrgggtgg ggttccctggg agggagacatc acgttccctt ctatccatgtt ctgaccccttgc
2281 tccttagccat ctggagatgtt aatggggccctt ggttcccttgc agggggccaa gtttggccacc
2341 atgtccgcctt tttccaggccat gatgttccctt gggaaatgtt gtcatgggg gaaaatcaagg
2401 atgttccatgtt taaggatccat gttttccatgt tttatgttccctt acacattgtat ggtgggtgacc
2461 ctgaggccatgtt agccatccatgtt

SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE ORF

MALNSGSPPAICPYYENHGQOPENPYPAQPTVVPTVYEVHPAQOYYPSPVPQYAPRVLQTQASNPVVCTQPKSPSGTV
CTSCKTKKALCITLTLGTFLVGAAAGLLWKFMSGSCKNSGIECDSSGTCINPSNWCDGVSHCPGGEDEMRCVRLV
GPNFILOMYSQRKSWHPVQCDDWNENYGRAACRDMGYKNNPFYSSQGIYVDDSGSTSPFMKLNTSAGNVDIVKKLYHS
DACSSKAVVSLRCLACGVNLNNSRQSRIVGGESALPGCAWPWOSLHVONVRVCGGSIIITPEWIIVTAAHCVEKPLNN
PWWHTAFAGILRQSFMFYGAZYQVQKVISHPNYDSKTKNNNDIALMKLOKPLTFNDLVLPVCLPNPGMMQLQPEQLCW
ISCGWGATEBKGTSEVLNAAKVLLIETQRCSNRYYDNLITPAMICAGFQGQNVDSQGDSCGGPLVTSNNNIWWLI
GDTSWGSGCAKAYRPGVYGNVMVFTDNIYRQMKG

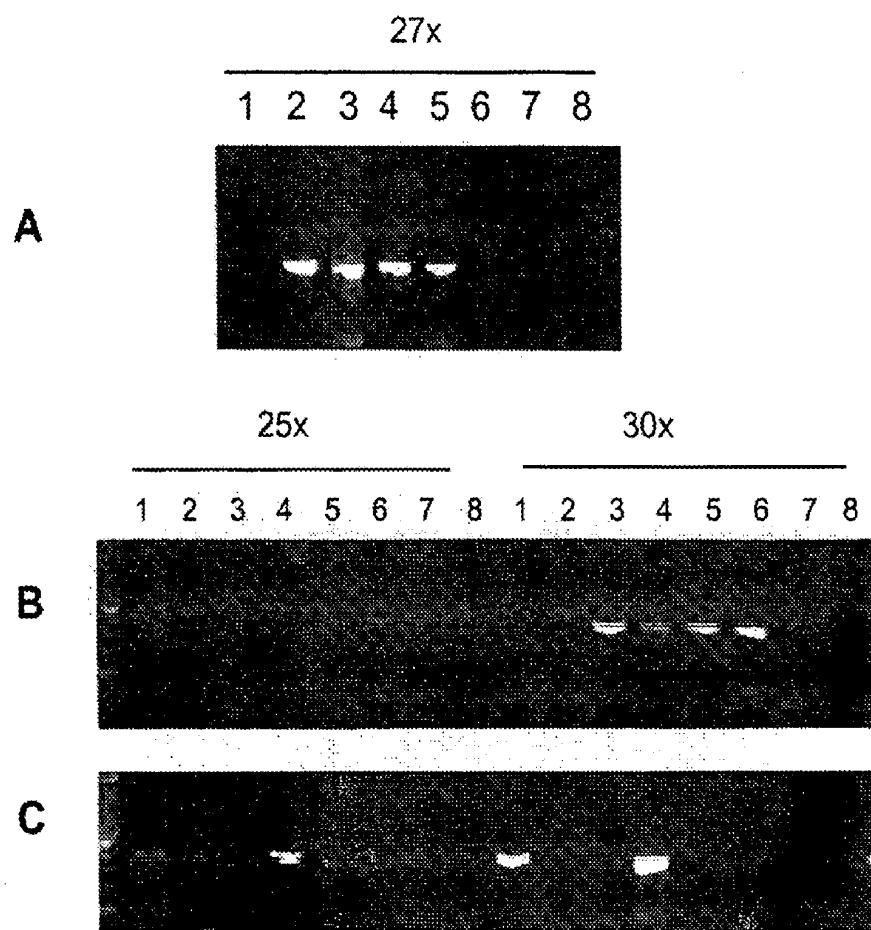
FIG 3

5/15

GTC1 15 16 30 31 45 46 60 61 75 76 90 MALNSGSPPAIGPY ENHGYOPENPYPAQP TVVPTVYEVHPAQY PSPVPOYAPRVLQA SNPVVCTOPKSPEGT VCTSKTKKALCITLT TMPRSS2 MALNSGSPPAIGPY ENHGYOPENPYPAQP TVVPTVYEVHPAQY PSPVPOYAPRVLQA SNPVVCTQPKSPSGT VCTSKTKKALCITLT	GTC1 91 105 106 120 121 135 136 150 151 165 166 180 LGTFLVGAALAAGLL WKFMGSKCSNSGIEC DSSGTCINPSNWCDG VSHCPGGEDENRCVR LYGPNFILQVYSSQR KSWHPVCQDDWNENY 180 TMPRSS2 LGTFLVGAALAAGLL WKFMGSKCSNSGIEC DSSGTCINPSNWCDG VSHCPGGEDENRCVR LYGPNFILQVYSSQR KSWHPVCQDDWNENY	GTC1 181 195 196 210 211 225 226 240 241 255 256 270 GRAACRDMGYKNNFY SSQGIVDDSGSTSFM KLNTSAGNVDIYKKL YHSDACSSKAVVSLR CLACGVNLNSRQR IVGGESALPGAWPWO 270 TMPRSS2 GRAACRDMGYKNNFY SSQGIVDDSGSTSFM KLNTSAGNVDIYKKL YHSDACSSKAVVSLR CLACGVNLNSRQR IVGGESALPGAWPWO	GTC1 271 285 286 300 301 315 316 330 331 345 346 360 VSLHVQVNHRVCGSI ITPEWIVTAAHCVKEK PLANNPHWHTAFAGIL RQSFMFYAGYQVK VISHPNYDSKTRNND IALMKLQKPLTFNDL 360 TMPRSS2 VSLHVQVNHRVCGSI ITPEWIVTAAHCVKEK PLANNPHWHTAFAGIL RQSFMFYAGYQVK VISHPNYDSKTRNND IALMKLQKPLTFNDL	GTC1 361 375 376 390 391 405 406 420 421 435 436 450 VKPVCLPNPGMMLQP EQLCWSGWATEEK GKTSEVILNAAKVLLI ETQRCRNSRYVYDNLI TPAMICAGFLOGNVD SCQGDGGPLVTSKN 450 TMPRSS2 VKPVCLPNPGMMLQP EQLCWSGWATEEK GKTSEVILNAAKVLLI ETQRCRNSRYVYDNLI TPAMICAGFLOGNVD SCQGDGGPLVTSNN 450	GTC1 451 465 466 480 481 495 496 510 511 525 526 540 NIWWLIGDTSWGSGC AKAYRPGVYGNVMVF TDWLYRQMRADG 492 TMPRSS2 NIWWLIGDTSWGSGC AKAYRPGVYGNVMVF TDWLYRQMRKANG 492
---	--	---	---	---	--

FIG 4

GATCTTCCCTGCTGAGTCCTTCCAGGGGCCAATTTGGATGAGCATGGAGCTGTCACCTCTCAGCTGCTGGATGAC
TTGAGATGAAAAAGGAGAGACATGGAAAGGGAGACAGGCCAGGTGGCACCTGCAGCGGCTGCCCTCTGGGGCCACTT
GGTAGTGTCCCCAGCCTACCTCTCCACAAGGGGATTTGCTGATGGGTTCTTANAGCCTTAGCAGCCCTGGATGGT
GGCCAGAAAATAAAGGGACCAGCCCTTCATGGGTGGTGACGTGGTANTCACTTGTAAAGGGAACAGAAACATTGTTG
TTCTTATGGGGTGAGAATATAGACAGTGCCCTGGTGCGAGGGAAAGCAATTGAAAAGGAACTTGCCCTGAGCACTC
CTGGTGCA

FIG. 5

- A**
1. Cérebro
 2. Próstata
 3. LAPC-4 AD
 4. LAPC-4 AI
 5. LAPC-9 AD
 6. HeLa
 7. ADNc murino
 8. Controlo neg.

- B**
1. Cérebro
 2. Coração
 3. Rim
 4. Fígado
 5. Pulmão
 6. Pâncreas
 7. Placenta
 8. Músculo-esquelético

- C**
1. Colón
 2. Ovário
 3. Leucócitos
 4. Próstata
 5. Intestino delgado
 6. Baço
 7. Testículo
 8. Timo

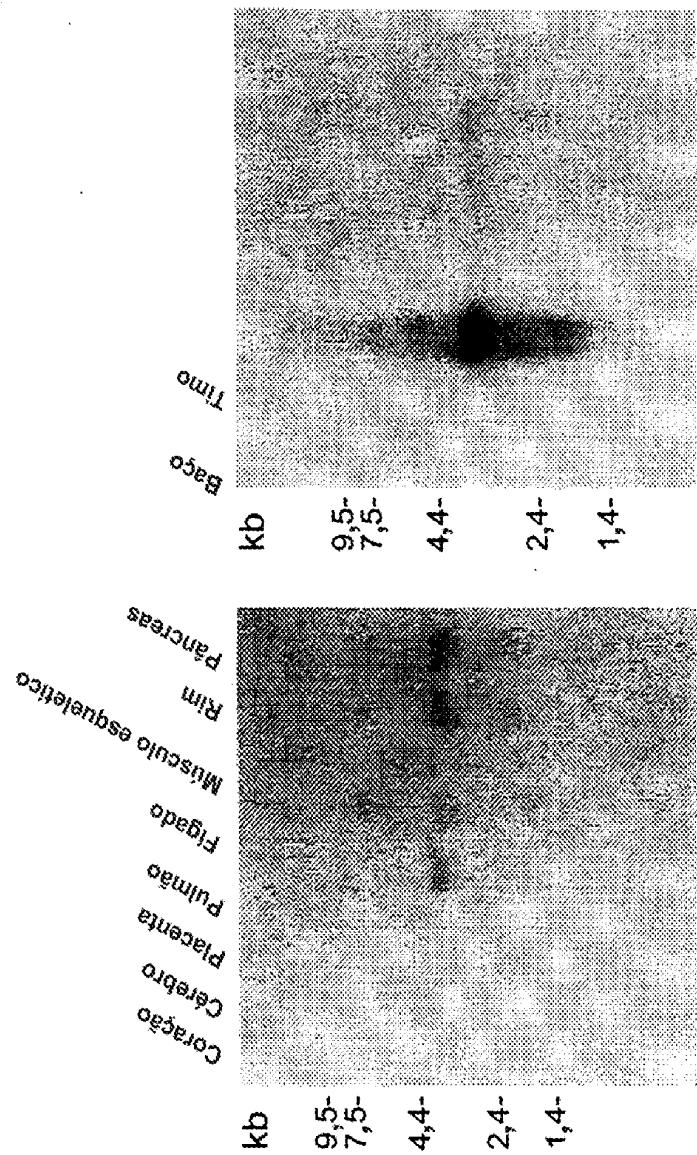
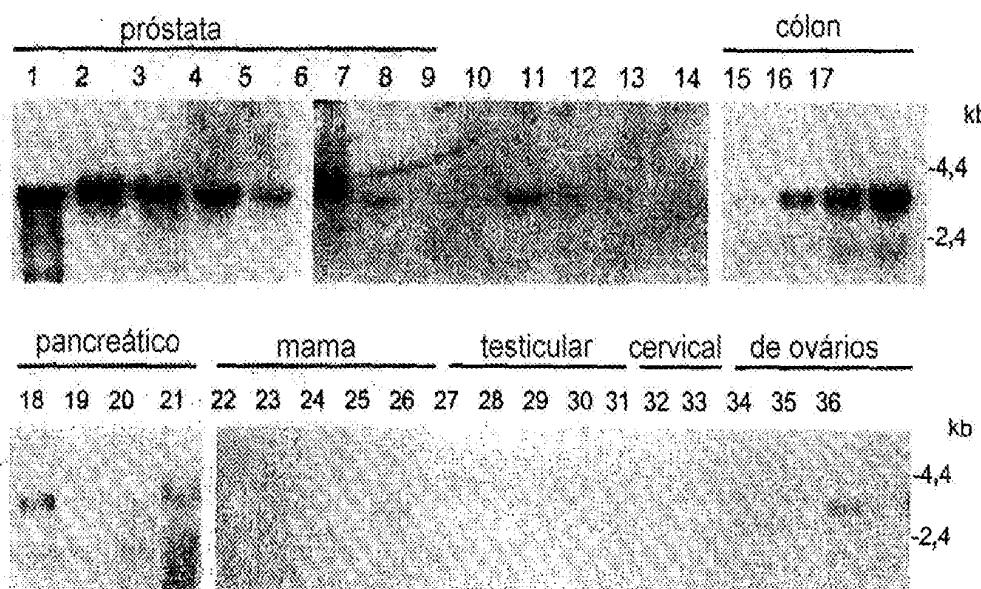
FIG. 6

FIG. 7

- | | | | |
|--------------|--------------|-----------------|-------------|
| 1. próstata | 14. CaCo-2 | 22. BT-20 | 31. A431 |
| 2. LAPC-4 AD | 15. LoVo | 23. CAMA-1 | 32. HeLa |
| 3. LAPC-4 AI | 16. T84 | 24. DU4475 | 33. OV-1063 |
| 4. LAPC-9 AD | 17. Colo-205 | 25. MCF-7 | 34. PA-1 |
| 5. LAPC-9 AI | | 26. MDA-MB-435s | 35. SW626 |
| 6. LNCaP | 18. PANC-1 | | 36. CAOV-3 |
| 7. PC-3 | 19. BxPC-3 | 27. NTERA-2 | |
| 8. DU145 | 20. HPAC | 28. NCCIT | |
| 9. HeLa | 21. Capan-1 | 29. TERA-1 | |
| 10. Colo 205 | | 30. TERA-2 | |
| 11. A431 | | | |
| 12. 293T | | | |
| 13. KCI-22 | | | |

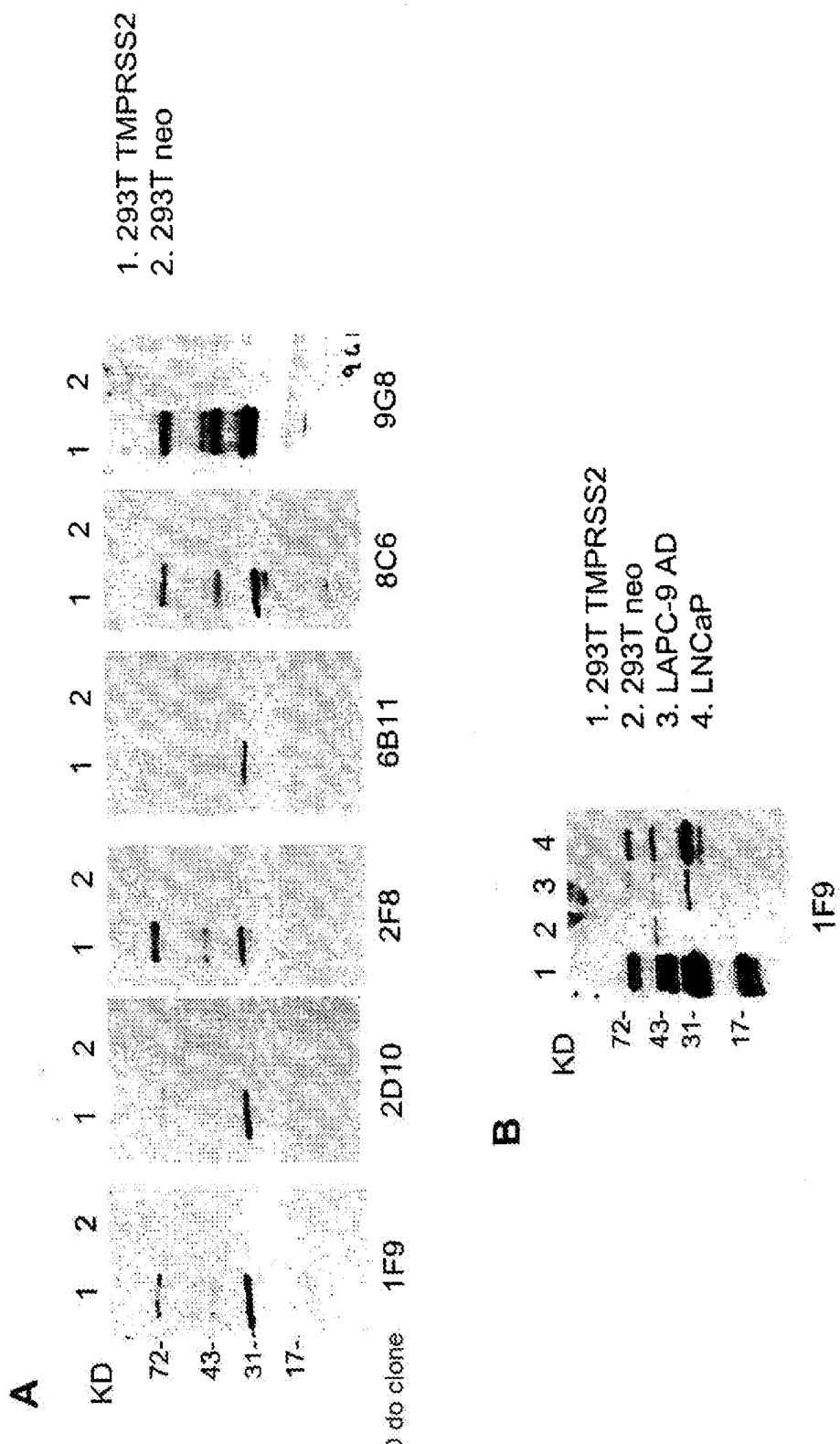
FIG. 8

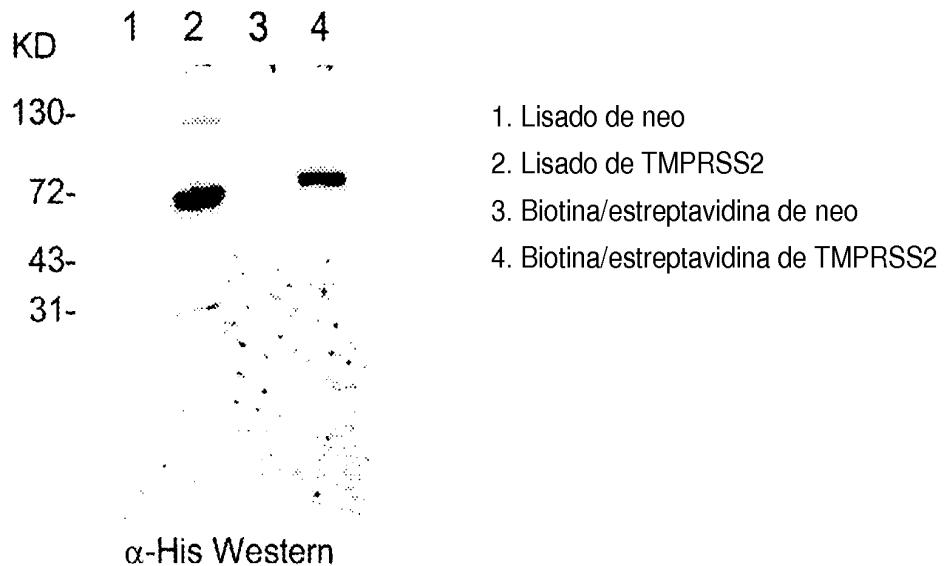
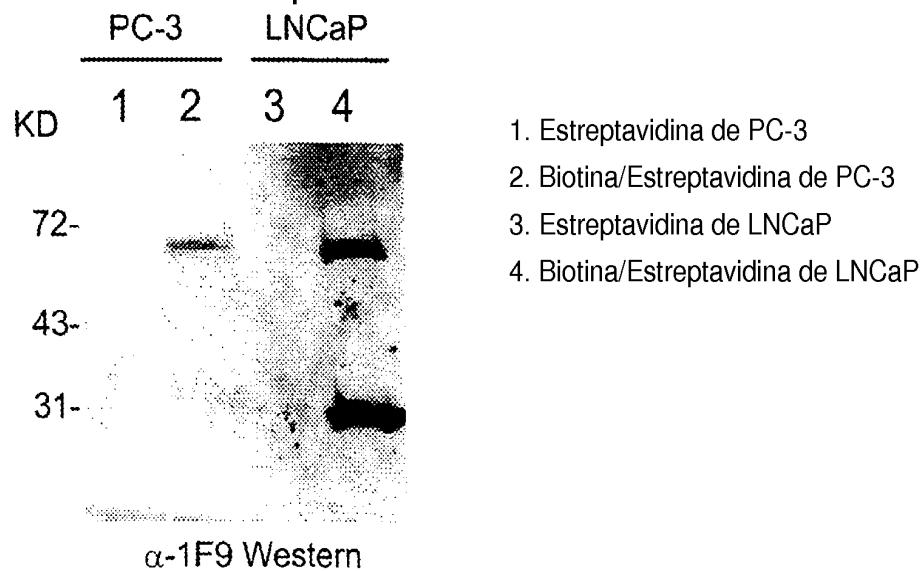
FIG. 9**A. Em células 293T transfectadas****B. Em células de cancro da próstata**

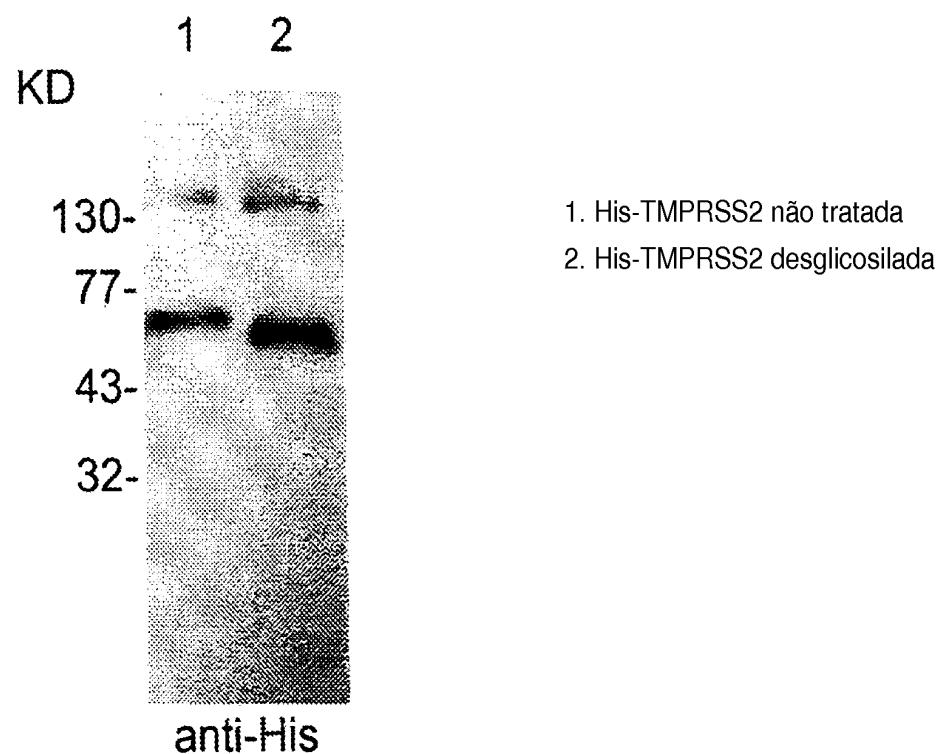
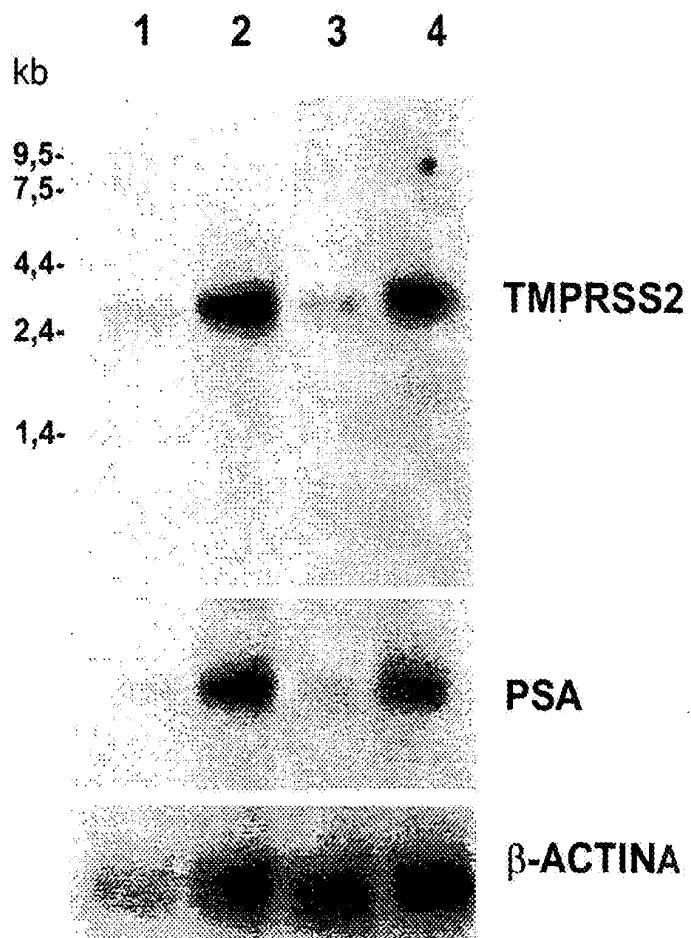
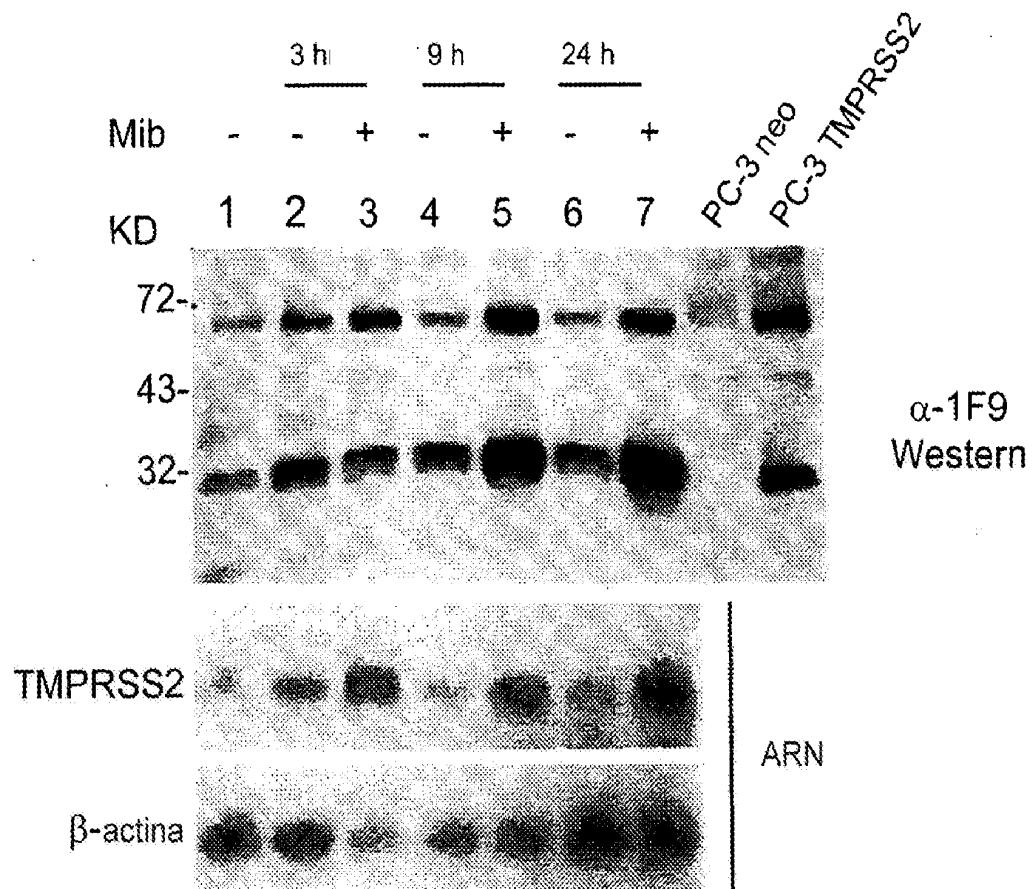
FIG. 10

FIG. 11**Painel**

1. LNCaP privadas de androgénio durante 1 semana
3. LNCaP privadas de androgénio durante 24 h + mock durante 9 h
4. LNCaP privadas de androgénio durante 24 h + Mib durante 9 h

FIG. 12

As células LNCaP foram privadas de androgénio durante 1 semana (cresceram em CS-FBS a 2%) e então foram estimuladas com milbolerona 10 nM por vários pontos de tempo

FIG. 13

