



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 276 390**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/12** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**C07K 1/00** (2006.01)

**C12P 19/34** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **94900538 .3**

86 Fecha de presentación : **05.11.1993**

87 Número de publicación de la solicitud: **0668777**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **30.08.1995**

54 Título: **Antígeno de membrana específico de la próstata.**

30 Prioridad: **05.11.1992 US 973337**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.06.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.06.2007**

73 Titular/es:  
**Sloan-Kettering Institute For Cancer Research  
1275 York Avenue  
New York, New York 10021, US**

72 Inventor/es: **Israeli, Ron S.;  
Heston, Warren D. W. y  
Fair, William R.**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 276 390 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Antígeno de membrana específico de la próstata.

5 **Antecedentes de la invención**

Esta invención descrita en la presente memoria se hizo en parte con ayuda del Gobierno con las Ayudas NIH No. DK47650 y CA58192 del Department of Health and Human Services. Por consiguiente, el Gobierno de EEUU tiene determinados derechos en esta invención.

10

A lo largo de esta solicitud se hace referencia a varias referencias entre paréntesis.

Las citas bibliográficas completas de estas referencias pueden encontrarse al final de cada serie de experimentos.

15

El cáncer de próstata es uno de los principales problemas médicos en los Estados Unidos, ya que la enfermedad es actualmente la malignidad más comúnmente diagnosticada en los varones Americanos. En 1992, hubo más de 132.000 nuevos casos de cáncer de próstata detectados con más de 36.000 muertes atribuibles a la enfermedad, lo que representa un 17,3% de incremento en 4 años (2). Las tasas de supervivencia en cinco años de los pacientes con cáncer de próstata varían entre el 88% de los que tienen la enfermedad localizada al 29% de los que tienen enfermedad metastásica. El rápido incremento del número de casos parece resultar en parte de un incremento del conocimiento de la enfermedad así como de la utilización generalizada de marcadores clínicos tales como las proteínas secretadas antígeno específico de la próstata (PSA) y fosfatasa ácida prostática (PAP) (37).

20

La glándula prostática es un sitio de patología significativa afectado por condiciones tales como crecimiento benigno (BPH), neoplasia (cáncer prostático) e infección (prostatitis). El cáncer de próstata representa la segunda causa principal de muerte de cáncer en los hombres (1). Sin embargo, el cáncer de próstata es el lugar principal de desarrollo de cáncer en los hombres. La diferencia entre estos dos hechos radica en que el cáncer de próstata aparece con una frecuencia incrementada al aumentar la edad de los hombres, especialmente en las edades superiores a 60 en un momento en el que frecuentemente se produce la muerte por otros factores. Además, el espectro de la agresividad biológica del cáncer de próstata es grande, por lo que en algunos hombres después de la detección el tumor permanece como un tumor histológico latente y no aparece como clínicamente significativo, mientras que en otros progresa rápidamente, metastatiza y mata al hombre en un periodo relativamente corto de 2-5 años (1,3).

25

30

En las células del cáncer de próstata, dos proteínas que se producen en muy altas concentraciones son la fosfatasa ácida prostática (PAP) y el antígeno específico de la próstata (PSA) (4,5,6). Estas proteínas han sido caracterizadas y se han utilizado para seguir la respuesta a la terapia. Con el desarrollo del cáncer, la arquitectura normal de la glándula se altera, incluyendo la pérdida de la estructura normal del conducto para la eliminación de secreciones por lo que las secreciones alcanzan el suero. La determinación de PSA sérico se ha sugerido como un método de cribado potencial para el cáncer de próstata. La cantidad relativa de PSA y/o PAP en el cáncer se reduce respecto al tejido normal o benigno.

35

40

PAP fue uno de los primeros marcadores séricos para detectar la diseminación metastásica (4). PAP hidroliza tirosina fosfato y tiene una amplia especificidad de sustrato. La fosforilación de tirosina se incrementa a menudo con la transformación oncogénica. Se ha hipotetizado que durante la transformación neoplásica existe una menor actividad fosfatasa disponible para inactivar proteínas que son activadas por fosforilación en restos tirosina. En algunos casos, la inserción de fosfatasas que tienen actividad tirosina fosfatasa ha revertido el fenotipo maligno.

45

PSA es una proteasa y no se aprecia fácilmente la correlación entre la pérdida de su actividad con el desarrollo del cáncer (5,6). La actividad proteolítica de PSA se inhibe por cinc. Las concentraciones de cinc son altas en la próstata normal y se reducen en el cáncer de próstata. Posiblemente la pérdida de cinc permite una actividad proteolítica incrementada de PSA. Debido a que las proteasas están implicadas en la metástasis y que algunas proteasas estimulan la actividad mitótica, podría pensarse que la actividad potencialmente incrementada de PSA juega un papel en la metástasis y diseminación de los tumores (7).

50

Tanto PSA como PAP se encuentran en secreciones prostáticas. Parece que ambos son dependientes de la presencia de andrógenos para su producción y se reducen sustancialmente después de la privación de andrógenos.

55

Se ha identificado el antígeno de membrana específico de la próstata (PSM) que parece estar localizado en la membrana prostática. Este antígeno se identificó como resultado de la generación de anticuerpos monoclonales frente a una célula de cáncer de próstata, LNCaP (8).

60

El Dr. Horoszewicz estableció una línea celular denominada LNCaP a partir del nódulo linfático de un paciente refractario a hormonas intensamente pretratado (9). Se vio que esta línea tiene un cariotipo masculino aneuploide. Mantuvo una función de diferenciación prostática ya que produjo tanto PSA como PAP. Poseía un receptor de andrógenos de alta afinidad y especificidad. Los ratones se inmunizaron con células LNCaP y se obtuvieron hibridomas a partir de animales sensibilizados. Se obtuvo un anticuerpo monoclonal y se denominó 7E11-C5 (8). La tinción con anticuerpo fue consistente con una localización en la membrana y las fracciones aisladas de membranas de células LNCaP presentaron una reacción muy positiva con técnicas de transferencia inmunoelectroforética y ELISA. Este

65

anticuerpo no inhibió ni incrementó el crecimiento de las células LNCaP *in vitro* o *in vivo*. El anticuerpo frente a este antígeno fue muy específico frente a células epiteliales prostáticas, ya que no se observó reactividad en ningún otro componente. La tinción inmunohistoquímica de las células epiteliales cancerosas fue más intensa que la de las células epiteliales normales o benignas.

5 El Dr. Horoszewicz también informó de la detección de material inmunorreactivo utilizando 7E11-C5 en el suero de pacientes con cáncer de próstata (8). La inmunoreactividad se detectó en cerca del 60% de los pacientes con enfermedad en estadio D-2 y en un porcentaje ligeramente inferior de los pacientes con enfermedad en un estadio más temprano, pero el número de pacientes en el último grupo fue menor. Los pacientes con hiperplasia prostática benigna (BPH) fueron negativos. Los pacientes con enfermedad no aparente fueron negativos, aunque el 50-60% de los pacientes en remisión pero con enfermedad estable activa o con progresión demostraron una reactividad sérica positiva. Los pacientes con tumores no prostáticos no mostraron inmunoreactividad con 7E11-C5.

15 El anticuerpo monoclonal 7E11-C5 está actualmente en ensayos clínicos. Los grupos aldehído del anticuerpo se oxidaron y se acopló el ligante-quelante glicol-tirosil-(n,ε-dietilentriamina-ácido pentacético)-lisina (GYK-DTPA) a los aldehídos reactivos de la cadena pesada (10). El anticuerpo resultante se denominó CYT-356. Los patrones de tinción inmunohistoquímica fueron similares excepto en que el anticuerpo modificado CYT-356 tiñó el músculo esquelético. La comparación entre CYT-356 y el anticuerpo monoclonal 7E11-C5 sugirió que ambos se unían a fibras musculares de tipo 2. Se sugirió que la razón de la discrepancia con el estudio previo, que mostró que el músculo esquelético era negativo, era debida a diferencias en las técnicas de fijación de los tejidos. Aún así, la reacción más intensa y definida se observó con células epiteliales prostáticas, especialmente células cancerosas. Se detectó reactividad con músculo esquelético de ratones mediante inmunohistoquímica pero no con estudios de imagen. El anticuerpo marcado con Indio<sup>111</sup> se localizó en tumores LNCaP crecidos en ratones desnudos con una captación de cerca del 30% de la dosis inyectada por gramo de tumor en cuatro días. *In vivo*, no se observó una retención selectiva del anticuerpo en tumores negativos para el antígeno tales como PC-3 y DU-145 o en músculo esquelético.

25 Se conocía muy poco acerca del antígeno PSM. Un resultado de purificación y caracterización ha sido descrito en congresos por el Dr. George Wright y colaboradores (11,12). Estos investigadores han mostrado que después de electroforesis en geles de acrilamida y transferencia Western, el antígeno PSM mantiene un peso molecular de 100 kilodalton (kd). El tratamiento químico y enzimático mostró que tanto los restos peptídicos como de carbohidrato del antígeno PSM se requerían para el reconocimiento por el anticuerpo monoclonal 7E11-C5. Los estudios de unión competitiva con lectinas específicas sugirieron que galNAc es el carbohidrato dominante del epítipo antigénico.

35 Se purificó y caracterizó la glicoproteína de 100kd específica de células y tejidos prostáticos. La proteína se digirió proteolíticamente con tripsina y se secuenciaron nueve fragmentos peptídicos. Utilizando la técnica de PCR degenerada (reacción en cadena de la polimerasa), se clonó el ADNc completo de 2,65 kilobases (kb) que codifica este antígeno. Los resultados preliminares han mostrado que este antígeno está altamente expresado en tejidos de cáncer de próstata, incluyendo metástasis en hueso y nódulo linfático (13). Se determinó la secuencia completa de ADN para el ADNc así como la secuencia predicha de aminoácidos para el antígeno. Actualmente se está realizando en el laboratorio de los solicitantes una caracterización adicional del antígeno PSM incluyendo: análisis de la expresión génica de PSM en una amplia variedad de tejidos, transfección del gen de PSM en células que no expresan el antígeno, localización cromosómica del gen de PSM, clonación del gen de PSM genómico con análisis del promotor de PSM y generación de anticuerpos policlonales y monoclonales frente a dominios peptídicos altamente antigénicos del antígeno PSM e identificación de cualquier molécula endógena que una PSM (ligandos).

45 Actualmente, las células LNCaP proporcionan el mejor sistema de modelo *in vitro* para estudiar el cáncer de próstata humano, ya que producen los tres marcadores prostáticos: PSA, PAP y PSM. Las células presentan un cariotipo aneuploide masculino con un cromosoma Y, expresan un receptor de andrógenos de alta afinidad y responden hormonalmente tanto a testosterona como a DHT. Debido a que PSM parece ser una glicoproteína transmembrana, se considera una diana atractiva tanto para la formación de imágenes dirigida por anticuerpos como para el reconocimiento de depósitos de tumor prostático (38). Hemos demostrado la expresión de la proteína PSM en membranas de células LNCaP y en células PC-3 transfectadas con ADNc de PSM y también la caracterización de la expresión del ARNm de PSM en tejidos humanos y en respuesta a hormonas esteroides.

## 55 Descripción breve de las figuras

Figura 1: La señal en el carril 2 representa el antígeno PSM de 100kD. Se utilizó EGFr como control positivo y se muestra en el carril 1. La incubación con anticuerpo anti-ratón de conejo (RAM) solo sirvió como control negativo y se muestra en el carril 3.

60 Figura 2 A-D: Las dos fotos superiores muestran citocentrifugados de LNCaP con tinción positiva para el antígeno PSM. En la parte inferior izquierda y derecha se muestran citocentrifugados de DU-145 y PC-3, respectivamente, ambos negativos para la expresión del antígeno PSM.

65 Figura 3 A-D: Los dos paneles superiores son secciones de próstata humana (BPH) con tinción positiva para el antígeno PSM. Los dos paneles inferiores muestran secciones de carcinoma humano de próstata invasivo con tinción positiva para la expresión del antígeno PSM.

## ES 2 276 390 T3

Figura 4: El antígeno PSM de 100kD después de inmunoprecipitación de células LNCaP marcadas con <sup>35</sup>S-Metionina con el anticuerpo Cyt-356.

Figura 5: Geles de agarosa al 3% teñidos con bromuro de etidio que muestran productos de PCR obtenidos utilizando los cebadores degenerados de antígeno PSM. La flecha indica la muestra IN-20, que es un producto de PCR de 1,1 kb que confirmamos más tarde como un ADNc parcial que codifica el gen de PSM.

Figura 6 A-B: Geles de agarosa al 2% de ADN plasmídico resultante de clonación TA de productos de PCR. Los insertos se escindieron del vector PCR II (Invitrogen Corp.) mediante digestión con EcoR1. En el carril 3 del gel 1 se muestra el producto de 1,1 kb del ADNc parcial del gen de PSM.

Figura 7: Autorradiograma que muestra el tamaño del ADNc representado en la biblioteca de LNCaP de los solicitantes utilizando transcriptasa inversa M-MLV.

Figura 8: Análisis de restricción de clones de longitud completa del gen de PSM obtenidos después de cribar la biblioteca de ADNc. Las muestras se cortaron con las enzimas de restricción Not I y Sal I para liberar el inserto.

Figura 9: Autorradiograma Southern del plásmido de los clones del gen de PSM de longitud completa. El tamaño es de aproximadamente 2,7 kb.

Figura 10: Transferencia Northern que muestra la expresión de PSM limitada a la línea de cáncer de próstata LNCaP y a la línea celular LNCaP transfectada con Ras H26. PC-3, DU-145, T-24, SKRC-27, HELA, MCF-7, HL-60 y otras fueron todas *negativas*.

Figura 11: Autorradiograma de análisis Northern que muestra la expresión del mensajero de PSM de 2,8 kb únicamente en la línea celular LNCaP (carril 1) pero no en las líneas celulares DU-145 (carril 2) y PC-3 (carril 3). El tamaño de la escalera de ARN se muestra a la izquierda (kb) y las bandas de ARN ribosomal 28S y 18S se indican a la derecha.

Figura 12 A-B: Resultados de PCR de tejidos de próstata humanos utilizando cebadores del gen PSM. Los carriles están numerados de izquierda a derecha. Carril 1, LNCaP; Carril 2, H26; Carril 3, DU-145; Carril 4, Próstata Normal; Carril 5, BPH; Carril 6, Cáncer de Próstata; Carril 7, BPH; Carril 8, Normal; Carril 9, BPH; Carril 10, BPH; Carril 11, BPH; Carril 12, Normal; Carril 13, Normal; Carril 14, Cáncer; Carril 15, Cáncer; Carril 16, Cáncer; Carril 17, Normal; Carril 18, Cáncer; Carril 19, IN-20 Control; Carril 20, ADNc de PSM.

Figura 13: Punto isoeléctrico del antígeno PSM (no glicosilado)

Figura 14: 1-8 Estructura secundaria del antígeno PSM

Figura 15: A-B A. Gráfico de hidrofiliidad del antígeno PSM

B. Predicción de los segmentos incluidos en la membrana

Figura 16: 1-11 Homología con la secuencia del receptor de la transferrina de pollo, rata y humano.

Figura 17A-C: Detección inmunohistoquímica de la expresión del antígeno PSM en líneas celulares de próstata. El panel superior muestra un nivel de expresión uniformemente alto en células LNCaP; el panel medio y el panel inferior son células DU-145 y PC-3 respectivamente, ambas *negativas*.

Figura 18: Autorradiograma de un gel de proteínas que muestra productos de transcripción/traducción acopladas *in vitro* de PSM. El polipéptido PSM no glicosilado se ve a 84 kDa (carril 1) y la glicoproteína PSM sintetizada después de la adición de microsomas se ve a 100 kDa (carril 2).

Figura 19: Análisis por transferencia Western que detecta la expresión de PSM en células PC-3 transfectadas que no expresan PSM. Se ve claramente una especie glicoproteica de PSM de 100 kDa en membranas de LNCaP (carril 1), lisado crudo de LNCaP (carril 2), y células PC-3 transfectadas con PSM (carril 4), pero no es detectable en células PC-3 nativas (carril 3).

Figura 20: Autorradiograma del gel de protección de ribonucleasa que ensaya la expresión del ARNm de PSM en tejidos humanos normales. En el carril 1 se muestra la escalera de ADN 1 kb marcado radiactivamente (Gibco-BRL). La sonda no digerida tiene 400 nucleótidos (carril 2), la banda de PSM protegido esperada tiene 350 nucleótidos y se muestra el ARNt control (carril 3). Se puede ver una señal intensa en próstata humana (carril 11), viéndose señales muy débiles pero detectables en cerebro humano (carril 4) y glándula salival humana (carril 12).

Figura 21: Autorradiograma del gel de protección de ribonucleasa que ensaya la expresión del ARNm de PSM en tumores LNCaP crecidos en ratones desnudos, y en tejidos prostáticos humanos. En el carril 1 se muestra la escalera de ADN de 1 kb marcado con <sup>32</sup>P. Se muestra (carril 2) la sonda no digerida de 298 nucleótidos y el ARNt control (carril 3). La expresión del ARNm de PSM se detecta claramente en células LNCaP (carril 4), tumores LNCaP crecidos

ortotópicamente en ratones desnudos con o sin matrigel (carriles 5 y 6), y tumores LNCaP implantados y crecidos subcutáneamente en ratones desnudos (carril 7). La expresión del ARNm de PSM también se puede ver en próstata humana normal (carril 8) y en adenocarcinoma prostático humano moderadamente diferenciado (carril 10). Se puede ver una expresión muy débil en una muestra de tejido prostático humano con hiperplasia benigna (carril 9).

5  
 10  
 Figura 22: Ensayo de protección de ribonucleasa para la expresión de PSM en células LNCaP tratadas con dosis fisiológicas de varios esteroides durante 24 horas. En el carril 1 se muestra la escalera de ADN marcado con <sup>32</sup>P. Se muestra (carril 2) la sonda no digerida de 298 nucleótidos y el ARNt control (carril 3). La expresión del ARNm de PSM es más alta en células LNCaP no tratadas en medio extraído con carbón (carril 4). El solicitante observa una expresión de PSM disminuida significativamente en células LNCaP tratadas con DHT (carril 5), Testosterona (carril 6), Estradiol (carril 7) y Progesterona (carril 8), con una pequeña respuesta a Dexametasona (carril 9).

15  
 Figura 23: Datos que ilustran los resultados de la presencia del ADN y ARN de PSM en líneas celulares Dunning transfectadas utilizando técnicas de transferencia Southern y Northern.

Figura 24: A-B La figura A indica el poder de células transfectadas con citoquinas para modificar células sin modificar. La administración se dirigió a las células parentales contiguas o prostáticas. Los resultados indican las consideraciones del microentorno.

20  
 La figura B indica la potencia real en un sitio particular. El tumor se implantó en células de próstata y se trató con células inmunes en dos sitios diferentes.

Figura 25: A-B Potencias relativas de las citoquinas en la inhibición del crecimiento de tumores primarios. Se administró a los animales células tumorales parentales sin modificar y como vacuna células transfectadas. La prostatectomía posterior del tumor del roedor resulta en un incremento de la supervivencia.

Figura 26: La amplificación por PCR con cebadores anidados mejoró nuestro nivel de detección de células prostáticas de aproximadamente una célula prostática por 10.000 células MCF-7 a más de una célula por millón de células MCF-7, utilizando cualquier PSA.

30  
 Figura 27: La amplificación por PCR con cebadores anidados mejoró nuestro nivel de detección de células prostáticas de aproximadamente una célula prostática por 10.000 células MCF-7 a más de una célula por millón de células MCF-7, utilizando cebadores obtenidos de PSM.

35  
 Figura 28: Una fotografía de gel teñido con etidio representativo para PSM-PCR. Las muestras que se corrieron en el carril A representan productos de PCR generados a partir de cebadores externos y las muestras en los carriles marcados con B son productos de pares de cebadores internos.

40  
 Figura 29: Autorradiografía de transferencia Southern de PSM. La sensibilidad de los análisis de transferencia Southern fue mayor que la de la tinción con etidio, como puede observarse en varias muestras en las que el producto externo no es visible en la figura 3 A-D, pero que es detectable mediante transferencia Southern como se muestra en la figura 4.

45  
 Figura 30: Características de los 16 pacientes analizados respecto a su estadio clínico, tratamiento, valores séricos de PSA y PAP y resultados del ensayo.

### Compendio de la invención

50  
 Esta invención proporciona una molécula de ácido nucleico de mamíferos aislada que codifica un antígeno de membrana específico de la próstata de mamíferos (PSM). El ácido nucleico de mamíferos aislado puede ser ADN, ADNc o ARN.

Esta invención también proporciona una molécula de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en:

55  
 (a) un ácido nucleico que codifica un antígeno polipeptídico de membrana específico de la próstata humano que tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2;

60  
 (b) un ácido nucleico que tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 o un fragmento de éste que codifica un área antigénica frente a la que puede generarse un anticuerpo que es específico del antígeno de membrana específico de la próstata humano que tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2; y

(c) un ácido nucleico que tiene al menos 15 nucleótidos consecutivos de la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1, o la cadena complementaria de ésta.

65  
 La molécula de ácido nucleico puede ser ADN o ARN.

Esta invención proporciona además un método para detectar la expresión del antígeno PSM que comprende obtener ARNm total de la célula y poner en contacto el ARNm así obtenido con una molécula de ácido nucleico específica

## ES 2 276 390 T3

del antígeno PSM marcada en condiciones de hibridación, determinando la presencia de ARNm hibridado a la sonda y detectando, por lo tanto, la expresión del antígeno PSM por la célula. El antígeno PSM puede detectarse de manera similar en secciones de tejido.

5 Esta invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada del antígeno PSM unida de manera operativa a un promotor de la transcripción de ARN. Esta invención proporciona además un vector que comprende una molécula de ácido nucleico de mamíferos aislada del antígeno PSM.

10 Esta invención también proporciona un ácido nucleico que codifica un antígeno polipeptídico de membrana específico de la próstata humano que tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2.

Esta invención proporciona además un vector que comprende la molécula de ácido nucleico descrita en la presente memoria.

15 Esta invención proporciona además un sistema de anfitrión vector para la producción de un polipéptido que tiene la actividad biológica de un antígeno PSM de mamíferos que comprende el vector que comprende la molécula de ácido nucleico de mamíferos que codifica un antígeno PSM de mamíferos y un anfitrión adecuado. El anfitrión adecuado para la expresión del antígeno PSM puede ser una célula bacteriana, célula de insectos o célula de mamíferos.

20 Además, esta invención proporciona una célula de mamíferos que comprende el vector descrito en la presente memoria.

25 Esta invención proporciona un método para determinar si un ligando puede unirse a un antígeno PSM de mamíferos que comprende poner en contacto una célula de mamíferos que tiene una molécula de ADN aislada de mamíferos que codifica un antígeno PSM de mamíferos con el ligando en condiciones que permitan la unión de ligandos al antígeno PSM de mamíferos y determinar si el ligando se une al antígeno PSM de mamíferos. Esta invención proporciona además ligandos que se unen al antígeno PSM.

30 Esta invención proporciona antígeno PSM de mamíferos purificado. Así, esta invención proporciona un polipéptido con la secuencia del antígeno de membrana específico de la próstata humano mostrada en la SEQ ID NO:2.

Esta invención también proporciona un polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico aislada de mamíferos que codifica un antígeno PSM de mamíferos.

35 De acuerdo con esto, esta invención proporciona un polipéptido con la secuencia del antígeno de membrana específico de la próstata humano mostrada en SEQ ID NO:2 o un área antigénica que es una secuencia de aminoácidos hidrofílica de dicho antígeno de membrana específico de la próstata humano, en la que el polipéptido puede utilizarse para generar anticuerpos que son específicos de dicho antígeno de membrana específico de la próstata humano, siempre que el área antigénica no consista en secuencias mostradas en SEQ ID NO:35. Esta invención proporciona además un método para identificar y purificar ligandos del antígeno PSM de mamíferos.

40 Esta invención proporciona además un método para producir tanto anticuerpos policlonales como monoclonales utilizando antígenos PSM purificados o polipéptidos codificados por una molécula de ácido nucleico aislada de mamíferos que codifica un antígeno PSM de mamíferos.

45 De acuerdo con esto, esta invención proporciona un anticuerpo monoclonal dirigido frente al antígeno de membrana específico de la próstata humano, mostrándose la secuencia de dicho antígeno en SEQ ID NO:2.

50 Esta invención proporciona anticuerpos policlonales y monoclonales dirigidos preferentemente, pero no limitados a, bien al péptido Asp-Glu-Leu-Lys-Ala-Glu (SEQ ID No:35) o Asn-Glu-Asp-Gly-Asn-Glu (SEQ ID No.36) o Lys-Ser-Pro-Asp-Glu-Gly (SEQ ID No. 37) del antígeno PSM o frente al dominio de membrana externo del antígeno PSM o frente a una secuencia de aminoácidos hidrofílica del antígeno PSM. Los anticuerpos de esta invención se caracterizan además por ser capaces de unirse a la superficie de una célula cancerosa de próstata.

55 Esta invención proporciona un agente terapéutico que comprende un anticuerpo dirigido frente a un antígeno PSM de mamíferos y un agente citotóxico conjugado con éste.

60 Esta invención también proporciona una utilización de al menos un anticuerpo dirigido frente al antígeno PSM para la preparación de una composición de diagnóstico para obtener imágenes del cáncer de próstata en pacientes humanos, en la que dicho anticuerpo es capaz de unirse a la superficie celular de la célula cancerosa de próstata y marcarse con un agente de imagen en condiciones tales que se forma un complejo entre el anticuerpo monoclonal y el antígeno PSM de la superficie celular. Esta invención proporciona además una composición que comprende una cantidad eficaz para obtener imágenes del anticuerpo dirigido frente al antígeno PSM y un vehículo aceptable desde un punto de vista farmacéutico.

65 Esta invención proporciona además una utilización de múltiples anticuerpos dirigidos frente a diferentes epítopos de PSM para la preparación de una composición de diagnóstico para obtener imágenes del cáncer de próstata en pacientes humanos.

## ES 2 276 390 T3

Esta invención también proporciona una utilización de un ácido nucleico marcado que tiene al menos 15 nucleótidos consecutivos de la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 para la preparación de una composición de diagnóstico para detectar la expresión del antígeno PSM en una célula o sección de tejido en una muestra.

5 Esta invención también proporciona una utilización del anticuerpo monoclonal o composición como se ha descrito en la presente memoria para la preparación de una composición farmacéutica para tratar el cáncer de próstata en un sujeto.

10 Esta invención proporciona un inmunoensayo para determinar la cantidad de antígeno PSM en una muestra biológica, por ejemplo suero, que comprende las etapas de a) poner en contacto la muestra biológica con al menos un anticuerpo PSM para formar un complejo con dicho anticuerpo y el antígeno PSM y b) determinar la cantidad de antígeno PSM en dicha muestra biológica determinando la cantidad de dicho complejo.

15 Esta invención proporciona un método para purificar antígeno PSM de mamíferos que comprende las etapas de: a) Acoplar el anticuerpo dirigido frente al antígeno PSM a una matriz sólida; b) incubar el anticuerpo acoplado de a) con un lisado celular que contiene antígeno PSM en condiciones que permitan la unión del anticuerpo y el antígeno PSM; c) lavar la matriz sólida acoplada para eliminar impurezas y d) eluir el antígeno PSM del anticuerpo unido.

20 Esta invención proporciona además mamíferos transgénicos no humanos que comprenden una molécula de ácido nucleico aislada del antígeno PSM. Esta invención también proporciona un mamífero transgénico no humano cuyo genoma comprende ADN antisentido complementario al ADN que codifica un antígeno PSM de mamíferos situado de manera que se transcribe en ARNm anti-sentido complementario al ARNm que codifica el antígeno PSM y que hibrida con el ARNm que codifica el antígeno PSM reduciendo así su traducción.

25 Esta invención proporciona una utilización de una molécula de ADN que codifica un antígeno de membrana específico de la próstata unido de manera operativa a un elemento regulador en posición 5' para la preparación de una composición farmacéutica para suprimir o modular la capacidad metastásica de las células de tumor de próstata, el crecimiento del tumor de próstata o eliminar las células del tumor de próstata, en la que dicha composición farmacéutica se introduce en una célula tumoral o sujeto, de manera que la expresión del antígeno de membrana específico de la próstata está bajo el control del elemento regulador, suprimiendo o modulando así la capacidad metastásica de las células del tumor de próstata, el crecimiento del tumor de próstata o eliminando las células del tumor de próstata.

30 Esta invención proporciona una utilización de una molécula de ADN que codifica un antígeno de membrana específico de la próstata unido de manera operativa a un elemento regulador en posición 5' acoplado con un ADN terapéutico para la preparación de una composición farmacéutica para suprimir o modular la capacidad metastásica de las células de tumor de próstata, el crecimiento del tumor de próstata o eliminar las células de tumor de próstata, en la que dicha composición farmacéutica se introduce en una célula tumoral de un sujeto, suprimiendo o modulando así la capacidad metastásica de las células del tumor de próstata, el crecimiento del tumor de próstata o eliminando las células del tumor de próstata.

40 Esta invención proporciona una vacuna terapéutica para prevenir el crecimiento del tumor de próstata humano o la estimulación de células del tumor de próstata en un sujeto. Dicha vacuna terapéutica y un vehículo aceptable desde un punto de vista farmacéutico pueden administrarse en una cantidad eficaz a la célula de la próstata, previniendo así el crecimiento del tumor o la estimulación de las células tumorales en el sujeto.

45 Esta invención proporciona un método para detectar células tumorales hematógenas micrometastásicas de un sujeto, que comprende (A) realizar la reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR) en muestras de sangre, médula ósea o nódulo linfático del sujeto utilizando los cebadores del antígeno de membrana específico de la próstata y (B) verificar las micrometástasis mediante secuenciación de ADN y análisis Southern, detectando así las células tumorales hematógenas micrometastásicas del sujeto.

50 Esta invención proporciona una utilización de una molécula de ADN que codifica el antígeno de membrana específico de la próstata unido de manera operativa a un elemento regulador en posición 5' para la preparación de una composición farmacéutica para eliminar la respuesta mitogénica debida a la transferrina, en la que dicha composición farmacéutica se introduce en una célula tumoral, la expresión de cuyo gen está asociada directamente con un efecto patológico definido en un organismo multicelular, eliminando así la respuesta mitogénica debida a la transferrina.

### Descripción detallada de la invención

60 A lo largo de esta solicitud, las referencias a nucleótidos específicos son a nucleótidos presentes en la hebra codificadora del ácido nucleico. Las abreviaturas estándar siguientes se utilizan a lo largo de la especificación para indicar nucleótidos específicos:

65 C=citosina            A=adenosina  
T=timidina            G=guanósina

## ES 2 276 390 T3

Un “gen” significa una molécula de ácido nucleico, cuya secuencia incluye toda la información requerida para la producción regulada normal de una proteína particular, incluyendo la secuencia codificadora estructural, promotores y amplificadores.

5 Esta invención proporciona un ácido nucleico aislado de mamíferos que codifica un antígeno de membrana específico de la próstata de mamíferos (PSM).

Esta invención proporciona además una molécula de ADN aislada de mamíferos de una molécula de ácido nucleico aislada de mamíferos que codifica un antígeno de membrana específico de la próstata de mamíferos. Esta invención  
10 también proporciona una molécula de ADNc aislada de mamíferos que codifica un antígeno de membrana específico de la próstata de mamíferos. Esta invención proporciona una molécula de ARN aislada de mamíferos que codifica un antígeno de membrana específico de la próstata de mamíferos.

En una realización preferida de esta invención, la secuencia nucleica aislada es ADNc de seres humanos como se muestra en la secuencia ID número 1. Esta secuencia humana se envió al GenBank (Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, Nuevo México) con el Número de Registro M99487 y la descripción como PSM, *Homo sapiens*, 2.653 pares de bases.

En esta referencia también se describen ADN y ADNc que codifican secuencias de aminoácidos que se diferencian de las del antígeno PSM, pero que no deberían producir cambios fenotípicos. Más aún, también se describen ADN y ADNc que hibridan con el ADN y ADNc de la presente invención. Los métodos de hibridación son muy conocidos para los expertos en la técnica.

Las moléculas de ADN de la presente invención también incluyen moléculas de ADN que codifican fragmentos polipeptídicos de polipéptidos antigénicos que se diferencian de las formas naturales en términos de identidad o localización de uno o más restos de aminoácidos (análogos de delección que no contienen todos los restos especificados para la proteína, análogos de sustitución en los que uno o más restos especificados están reemplazados por otros restos y análogos de adición en los que se añaden uno o más restos de aminoácidos a una parte terminal o media de los polipéptidos) y que comparten algunas o todas las propiedades de las formas naturales. Estas moléculas incluyen: la  
30 incorporación de codones “preferidos” para la expresión por anfitriones no mamíferos seleccionados; la provisión de sitios para la degradación por enzimas endonucleasas de restricción; y la provisión de secuencias de ADN adicionales iniciales, terminales o intermedias que facilitan la construcción de vectores que se expresan fácilmente.

Las moléculas de ADN descritas y reivindicadas en la presente memoria son útiles por la información que proporcionan respecto a la secuencia de aminoácidos del polipéptido y como productos para la síntesis a gran escala del polipéptido mediante diferentes técnicas recombinantes. La molécula es útil para generar nuevos vectores de clonación y expresión, células anfitrionas procariontas y eucariotas transformadas y transfectadas, y métodos nuevos y útiles para el crecimiento en cultivo de dichas células anfitrionas capaces de expresar el polipéptido y productos relacionados.

Más aún, las moléculas de ácido nucleico aisladas de mamíferos que codifican un antígeno de membrana específico de la próstata de mamíferos son útiles para el desarrollo de sondas para estudiar la tumorigénesis del cáncer de próstata.

Esta invención también proporciona moléculas de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos capaces de hibridar específicamente con una secuencia de una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno de membrana específico de la próstata.

Esta molécula de ácido nucleico producida puede ser ADN o ARN. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la expresión “hibridar específicamente” significa la capacidad de una molécula de ácido nucleico para reconocer una secuencia de ácido nucleico complementaria a ella y para formar segmentos de doble hélice mediante puentes de hidrógeno entre los pares de bases complementarios.

Esta molécula de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos capaz de hibridar específicamente con una secuencia de una molécula de ácido nucleico que codifica el antígeno de membrana específico de la próstata puede utilizarse como sonda. La tecnología de sondas de ácidos nucleicos es muy conocida para los expertos en la técnica que apreciarán fácilmente que dichas sondas pueden variar mucho en longitud y pueden marcarse con un marcador detectable, tal como un radioisótopo o marcador fluorescente, para facilitar la detección de la sonda. Las sondas de moléculas de ADN pueden producirse por inserción de una molécula de ADN que codifica el antígeno PSM en vectores adecuados, tales como plásmidos o bacteriófagos, seguido de transformación en células bacterianas anfitrionas adecuadas, replicación en las células bacterianas anfitrionas transformadas y recogida de las sondas de ADN utilizando métodos muy conocidos en la técnica.

Alternativamente, las sondas pueden generarse químicamente a partir de sintetizadores de ADN.

Las sondas de ARN pueden generarse insertando la molécula del antígeno PSM en posición 3' respecto a un promotor de bacteriófago tal como T3, T7 o SP6. Pueden producirse grandes cantidades de sonda de ARN incubando los nucleótidos marcados con el fragmento del antígeno PSM linearizado que contiene un promotor en posición 5' en presencia de la polimerasa de ARN apropiada.

Esta invención también proporciona una molécula de ácido nucleico de al menos 15 nucleótidos capaz de hibridar específicamente con una secuencia de una molécula de ácido nucleico que es complementaria a la molécula de ácido nucleico de mamíferos que codifica un antígeno de membrana específico de la próstata de mamíferos. Esta molécula puede ser una molécula de ADN o ARN.

5

La presente invención proporciona además un método para detectar la expresión de un antígeno PSM de mamíferos en una célula que comprende obtener el ARNm total de la célula, poner en contacto el ARNm así obtenido con una molécula de ácido nucleico marcada de al menos 15 nucleótidos capaz de hibridar específicamente con una secuencia de la molécula del ácido nucleico que codifica un antígeno PSM de mamíferos en condiciones de hibridación, determinando la presencia del ARNm hibridado a la molécula y detectando así la expresión del antígeno de membrana específico de la próstata de mamíferos en la célula. Las moléculas de ácido nucleico sintetizadas anteriormente pueden utilizarse para detectar la expresión de un antígeno PSM detectando la presencia del ARNm que codifica el antígeno PSM. El ARNm total de la célula puede aislarse mediante muchos procesos muy conocidos por el experto en la técnica. Las condiciones de hibridación de las moléculas de ácido nucleico marcadas pueden determinarse por experimentación rutinaria muy conocida en la técnica. La presencia de ARNm hibridado a la sonda puede determinarse mediante electroforesis en gel u otros métodos conocidos en la técnica. Determinando la cantidad de híbrido realizado, puede determinarse la expresión del antígeno PSM por la célula. El marcaje puede ser radiactivo. Por ejemplo, uno o más nucleótidos radiactivos pueden incorporarse al ácido nucleico cuando éste se hace.

En una realización de esta invención, los ácidos nucleicos se extraen mediante precipitación a partir de células lisadas y se aísla el ARNm del extracto utilizando una columna de oligo-dT que une las colas poli-A de las moléculas de ARNm (13). El ARNm se expone entonces a una sonda marcada con radiactividad en una membrana de nitrocelulosa y la sonda se hibrida a y marca así las secuencias de ARNm complementarias. La unión puede detectarse mediante autorradiografía luminiscente o conteo de centelleo. Sin embargo, otros métodos para realizar estas etapas son muy conocidos para los expertos en la técnica y la discusión anterior es sólo un ejemplo.

25

Esta invención proporciona además otro método para detectar la expresión de un antígeno PSM en secciones de tejido que comprende poner en contacto las secciones de tejido con una molécula de ácido nucleico marcada de al menos 15 nucleótidos capaz de hibridar específicamente con una secuencia de la molécula de ácido nucleico que codifica un antígeno PSM de mamíferos en condiciones de hibridación, determinando la presencia del ARNm hibridado a la molécula y detectando así la expresión del antígeno PSM de mamíferos en secciones de tejido. Las sondas también son útiles para hibridación *in situ* o con el fin de localizar tejidos que expresan este gen, o para otros ensayos de hibridación para detectar la presencia de este gen o su ARNm en diferentes tejidos biológicos. La hibridación *in situ* utilizando una molécula de ácido nucleico marcada es muy conocida en la técnica. Esencialmente, se incuban secciones de tejido con la molécula de ácido nucleico marcada para permitir que se produzca la hibridación. La molécula incluirá un marcador para la detección porque está "marcada" y la cantidad del híbrido se determinará tomando como base la detección de la cantidad de marcador y por lo tanto también la expresión del antígeno PSM.

30

Esta invención proporciona además la molécula de ácido nucleico del antígeno PSM aislada unida de manera operativa a un promotor de la transcripción de ARN. La secuencia del antígeno PSM aislada puede unirse a sistemas de vectores. Varios vectores incluyendo vectores plasmídicos, vectores cósmidos, vectores de bacteriófagos y otros virus son muy conocidos para los expertos en la técnica. Esta invención proporciona además un vector que comprende la molécula de ácido nucleico aislada que codifica el antígeno PSM.

Como ejemplo para obtener estos vectores, el ADN de insertos y vectores puede exponerse a una enzima de restricción para crear extremos complementarios en ambas moléculas que tienen bases complementarias y entonces se ligan con ADN ligasa. Alternativamente, pueden ligarse ligantes al inserto de ADN que se corresponde con un sitio de restricción en el ADN del vector, que se digiere entonces con la enzima de restricción que corta en ese sitio. Otros medios también están disponibles y son conocidos por el experto en la técnica.

45

En una realización, la secuencia de PSM se clona en el sitio Not I/Sal I del vector pSPORT (Gibco®-BRL). Este plásmido, p55A-PSM, se depositó el 14 de agosto de 1992 en la American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, EEUU bajo el Tratado de Budapest en el Reconocimiento Internacional de Depósito de Microorganismos a los Fines del Procedimiento en Materia de Patentes. Se asignó al plásmido p55A-PSM el Número de Registro ATCC 75294.

50

Esta invención proporciona además un sistema anfitrión vector para la producción de un polipéptido que tiene la actividad biológica del antígeno de membrana específico de la próstata. Estos vectores pueden transformarse en una célula anfitriona adecuada para formar un sistema anfitrión vector para la producción de un polipéptido que tiene la actividad biológica del antígeno PSM.

Los elementos reguladores requeridos para la expresión incluyen secuencias promotoras para unir ARN polimerasa y secuencias de inicio de la transcripción para unión a ribosomas. Por ejemplo, un vector de expresión bacteriano incluye un promotor tal como el promotor lac y para el inicio de la transcripción la secuencia Shine-Dalgarno y el codón de inicio AUG (14). De manera similar, un vector de expresión eucariota incluye un promotor heterólogo u homólogo para la ARN polimerasa II, una señal de poliadenilación en posición 3', el codón de inicio AUG y un codón de terminación para la desunión al ribosoma. Dichos vectores pueden obtenerse comercialmente o construirse a partir de las secuencias descritas mediante métodos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, los métodos descritos ante-

60

Los elementos reguladores requeridos para la expresión incluyen secuencias promotoras para unir ARN polimerasa y secuencias de inicio de la transcripción para unión a ribosomas. Por ejemplo, un vector de expresión bacteriano incluye un promotor tal como el promotor lac y para el inicio de la transcripción la secuencia Shine-Dalgarno y el codón de inicio AUG (14). De manera similar, un vector de expresión eucariota incluye un promotor heterólogo u homólogo para la ARN polimerasa II, una señal de poliadenilación en posición 3', el codón de inicio AUG y un codón de terminación para la desunión al ribosoma. Dichos vectores pueden obtenerse comercialmente o construirse a partir de las secuencias descritas mediante métodos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, los métodos descritos ante-

65

## ES 2 276 390 T3

riormente para construir vectores en general. Los vectores de expresión son útiles para producir células que expresan el antígeno PSM.

5 Esta invención proporciona además una molécula de ADN o ADNc aislada descrita anteriormente en la presente memoria en la que la célula anfitriona se selecciona del grupo que consiste en células bacterianas (tal como *E. coli*), células de levadura, células fúngicas, células de insecto y células animales. Las células animales adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, células Vero, células HeLa, células Cos, células CV1 y varias células primarias de mamíferos.

10 Esta invención proporciona además un método para producir un polipéptido que tiene la actividad biológica del antígeno de membrana específico de la próstata que comprende crecer las células anfitrionas de un sistema de vector que contiene la secuencia del antígeno PSM en condiciones adecuadas que permitan la producción del polipéptido y la recuperación del polipéptido así producido.

15 Esta invención proporciona una célula de mamífero que comprende una molécula de ADN que codifica un antígeno PSM de mamíferos, tal como una célula de mamífero que comprende un plásmido adaptado para la expresión en una célula de mamífero, que comprende una molécula de ADN que codifica un antígeno PSM de mamíferos y los elementos reguladores necesarios para la expresión del ADN en la célula de mamífero localizados respecto al ADN que codifica el antígeno PSM de mamíferos de tal manera que permitan la expresión de éste.

20 Pueden utilizarse numerosas células de mamíferos como anfitriones, incluyendo, pero sin limitarse a, la célula de fibroblastos de ratón NIH3T3, células CHO, células HeLa, células Ltk, células Cos, etc. Los plásmidos de expresión tales como los descritos anteriormente pueden utilizarse para transfectar células de mamíferos mediante métodos conocidos en la técnica tales como precipitación con fosfato de calcio, electroporación o el ADN que codifica el antígeno PSM de mamíferos puede introducirse de otra manera en las células de mamíferos, por ejemplo, por microinyección, para obtener células de mamíferos que comprenden ADN, por ejemplo ADNc o un plásmido, que codifica un antígeno PSM de mamíferos.

30 Esta invención proporciona un método para determinar si un ligando puede unirse a un antígeno de membrana específico de la próstata de mamíferos que comprende poner en contacto una célula de mamífero que comprende una molécula de ADN aislada que codifica un antígeno de membrana específico de la próstata de mamíferos con el ligando en condiciones que permitan la unión de ligandos al antígeno de membrana específico de la próstata de mamíferos, y determinar así si el ligando se une al antígeno de membrana específico de la próstata de mamíferos.

35 En la presente memoria también se proporcionan ligandos unidos al antígeno PSM de mamíferos.

Más aún, en la presente memoria también se proporciona un agente terapéutico que comprende un ligando identificado por el método descrito anteriormente y un agente citotóxico conjugado con éste. El agente citotóxico puede ser un radioisótopo o una toxina. Los ejemplos de radioisótopos o toxinas son muy conocidos para el experto en la técnica.

40 Los vehículos aceptables desde un punto de vista farmacéutico son muy conocidos para el experto en la técnica. Por ejemplo, dicho vehículo aceptable desde un punto de vista farmacéutico puede ser disolución salina fisiológica.

45 También se proporciona por esta invención un antígeno PSM de mamíferos purificado. Cuando se utiliza en la presente memoria, la expresión "antígeno de membrana específico de la próstata purificado" significa antígeno de membrana específico de la próstata natural aislado o proteína (purificada a partir de la naturaleza o fabricada de manera que la conformación primaria, secundaria y terciaria y las modificaciones posteriores a la traducción son idénticas al material natural) así como polipéptidos no naturales que tienen una conformación estructural primaria (es decir, secuencia continua de restos de aminoácidos). Dichos polipéptidos incluyen derivados y análogos.

50 Esta invención proporciona además un polipéptido codificado por la secuencia del ácido nucleico de mamíferos aislada del antígeno PSM.

55 Se piensa que pueden existir ligandos naturales que interaccionan con el antígeno PSM. Esta invención proporciona un método para identificar dicho ligando natural u otro ligando que puede unirse al antígeno PSM. Un método para identificar el ligando comprende a) acoplar el antígeno PSM de mamíferos purificado a una matriz sólida, b) incubar la proteína PSM de mamíferos purificada acoplada con los ligandos potenciales en condiciones que permitan la unión de los ligandos y el antígeno PSM purificado; c) lavar el complejo del ligando y el antígeno PSM de mamíferos purificado acoplado formado en b) para eliminar la unión no específica y las impurezas y finalmente d) eluir el ligando del antígeno PSM de mamíferos purificado unido. Las técnicas de acoplamiento de proteínas a una matriz sólida son muy conocidas en la técnica. Los ligandos potenciales pueden deducirse de la estructura del PSM de mamíferos o mediante otros experimentos empíricos conocidos por los expertos en la técnica. Las condiciones de la unión también pueden determinarse fácilmente y los protocolos para llevar a cabo dichos experimentos están muy bien documentados (15). El complejo ligando-antígeno PSM se lavará. Finalmente, el ligando unido se eluirá y se caracterizará. Las técnicas estándar de caracterización de ligandos son muy conocidas en la técnica.

65 El método anterior también puede utilizarse para purificar ligandos a partir de cualquier fuente biológica. Para la purificación de ligandos naturales en la célula, se utilizarán lisados celulares, suero u otras muestras biológicas

## ES 2 276 390 T3

para incubarlas con el antígeno PSM de mamíferos unido a la matriz. El ligando natural específico se identificará y purificará como se ha descrito anteriormente.

5 Con la información de la secuencia de la proteína, pueden identificarse áreas antigénicas y pueden generarse anticuerpos dirigidos frente a estas áreas y dirigidos al cáncer de próstata para obtener imágenes del cáncer o terapias.

Esta invención proporciona un anticuerpo dirigido frente a la secuencia de aminoácidos de un antígeno PSM de mamíferos.

10 Esta invención proporciona un método para seleccionar regiones específicas en el antígeno PSM para generar anticuerpos. La secuencia de la proteína puede determinarse a partir de la secuencia de ADN de PSM. Las secuencias de aminoácidos pueden analizarse mediante métodos muy conocidos por los expertos en la técnica para determinar si producen regiones hidrofóbicas o hidrofílicas en las proteínas de las que forman parte. En el caso de proteínas de las membranas celulares, se sabe que las regiones hidrofóbicas forman la parte de la proteína que está insertada en la bicapa lipídica de la membrana celular, mientras que las regiones hidrofílicas están localizadas en la superficie celular, en un medio acuoso. Habitualmente, las regiones hidrofílicas serán más inmunogénicas que las regiones hidrofóbicas. Por lo tanto, las secuencias de aminoácidos hidrofílicas pueden seleccionarse y utilizarse para generar anticuerpos específicos frente al antígeno PSM de mamíferos. Por ejemplo, las secuencias hidrofílicas del antígeno PSM humano mostradas en el gráfico de hidrofiliidad de la Figura 16 pueden seleccionarse fácilmente. Los péptidos seleccionados pueden prepararse utilizando equipos disponibles comercialmente. Como alternativa, el ADN, tal como un ADNc o un fragmento de éste, puede clonarse y expresarse y recuperarse el polipéptido resultante y utilizarse como un inmunógeno.

15 Pueden producirse anticuerpos policlonales frente a estos péptidos inmunizando animales utilizando los péptidos seleccionados. Los anticuerpos monoclonales se preparan utilizando la tecnología del hibridoma fusionando células B productoras de anticuerpos de animales inmunizados con células de mieloma y seleccionando la línea celular de hibridoma resultante que produce el anticuerpo deseado. Alternativamente, los anticuerpos monoclonales pueden producirse mediante técnicas *in vitro* conocidas por el experto en la técnica. Estos anticuerpos son útiles para detectar la expresión del antígeno PSM de mamíferos en animales vivos, en seres humanos, o en tejidos o fluidos biológicos aislados de animales o seres humanos.

20 En una realización, se seleccionan los péptidos Asp-Glu-Leu-Lys-Ala-Glu (SEQ ID No. 35), Asn-Glu-Asp-Gly-Asn-Glu (SEQ ID No. 36) y Lys-Ser-Pro-Asp-Glu-Gly (SEQ ID No. 37) del antígeno PSM humano.

25 Esta invención proporciona además anticuerpos policlonales y monoclonales frente a los péptidos Asp-Glu-Leu-Lys-Ala-Glu (SEQ ID No. 35), Asn-Glu-Asp-Gly-Asn-Glu (SEQ ID No. 36) y Lys-Ser-Pro-Asp-Glu-Gly (SEQ ID No. 37).

30 Esta invención proporciona un agente terapéutico que comprende anticuerpos o ligando (s) dirigidos frente al antígeno PSM y un agente citotóxico conjugado con éste o enzimas unidas a anticuerpos que activan el profármaco para matar el tumor. El agente citotóxico puede ser un radioisótopo o una toxina.

35 Esta invención proporciona una utilización de un anticuerpo monoclonal dirigido frente al péptido del antígeno PSM de mamíferos para la preparación de una composición farmacéutica para obtener imágenes del cáncer de próstata en pacientes humanos, en la que dicho anticuerpo monoclonal es capaz de unirse a la superficie celular de la célula del cáncer de próstata y marcarse con un agente de imagen en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo monoclonal y el antígeno de membrana específico de la superficie celular de la próstata. El agente de imagen es un radioisótopo tal como Indio<sup>111</sup>. Esta invención proporciona además un agente de imagen específico del cáncer de próstata que comprende el anticuerpo dirigido frente al antígeno PSM y un radioisótopo conjugado con éste.

40 Esta invención también proporciona una composición que comprende una cantidad de eficaz para la obtención de imágenes del anticuerpo dirigido frente al antígeno PSM y un vehículo aceptable desde un punto de vista farmacéutico. Los métodos para determinar cantidades eficaces para la obtención de imágenes son muy conocidos por el experto en la técnica. Un método es mediante titulación utilizando diferentes cantidades del anticuerpo.

45 Esta invención proporciona además un inmunoensayo para determinar la cantidad del antígeno de membrana específico de la próstata en una muestra biológica que comprende las etapas de a) poner en contacto la muestra biológica con al menos un anticuerpo dirigido frente al antígeno PSM para formar un complejo con dicho anticuerpo y el antígeno de membrana específico de la próstata, y b) determinar la cantidad del antígeno de membrana específico de la próstata en dicha muestra biológica determinando la cantidad de dicho complejo. Un ejemplo de la muestra biológica es una muestra de suero.

50 Esta invención proporciona un método para purificar antígeno de membrana específico de la próstata de mamíferos que comprende las etapas de a) acoplar el anticuerpo dirigido frente al antígeno PSM a una matriz sólida; b) incubar el anticuerpo acoplado de a) con lisado que contiene el antígeno de membrana específico de la próstata en la condición en la que puedan unirse el anticuerpo y el antígeno de membrana específico de la próstata; c) lavar la matriz sólida para eliminar impurezas y d) eluir el antígeno de membrana específico de la próstata del anticuerpo acoplado.

## ES 2 276 390 T3

Esta invención también proporciona un mamífero transgénico no humano que comprende la molécula de ácido nucleico aislada que codifica un antígeno PSM de mamíferos. Esta invención proporciona además un mamífero transgénico no humano cuyo genoma comprende ADN antisentido complementario al ADN que codifica un antígeno de membrana específico de la próstata de mamíferos situado de manera que se transcribe en ARNm antisentido complementario al ARNm que codifica el antígeno de membrana específico de la próstata y que hibrida con el ARNm que codifica el antígeno específico de la próstata reduciendo así su traducción.

Los sistemas de modelos animales que esclarecen los papeles fisiológicos y funcionales del antígeno PSM de mamíferos se producen creando animales transgénicos en los que la expresión del antígeno PSM está incrementada o disminuida o la secuencia de aminoácidos del antígeno PSM expresado está alterada mediante diferentes técnicas. Los ejemplos de estas técnicas incluyen, pero no están limitados a: 1) Inserción de versiones normales o mutantes del ADN que codifica un antígeno PSM de mamíferos, mediante microinyección, electroporación, transfección retroviral u otros medios muy conocidos para los expertos en la técnica, en embriones no humanos apropiados fertilizados con el fin de producir un animal transgénico no humano (16) o 2) Recombinación homóloga (17) de versiones mutantes o normales, humanas o animales de estos genes con el locus del gen nativo en animales transgénicos para alterar la regulación de la expresión o la estructura de estas secuencias del antígeno PSM. La técnica de recombinación homóloga es muy conocida en la técnica. Reemplaza el gen nativo con el gen insertado y de esta manera es útil para producir un animal que no puede expresar el antígeno PSM nativo pero que expresa, por ejemplo, un antígeno PSM mutante insertado que ha reemplazado el antígeno PSM nativo en el genoma del animal por recombinación, lo que resulta en una expresión menor del transportador. La microinyección añade genes al genoma, pero no los elimina, y de esta manera es útil para producir un animal que expresa antígenos PSM propios y añadidos, lo que resulta en una sobreexpresión de los antígenos PSM.

Un medio disponible para producir un animal transgénico no humano con un ratón como ejemplo, es como sigue: Se aparean ratones hembra y los huevos fertilizados resultantes se extraen de sus oviductos. Los huevos se almacenan en un medio apropiado tal como medio M2 (16). Se purifica el ADN o ADNc que codifica el antígeno PSM de mamíferos a partir de un vector mediante métodos muy conocidos en la técnica. Pueden fusionarse promotores inducibles con la región codificadora del ADN para proporcionar un medio experimental para regular la expresión del transgén. Alternativamente o además, pueden fusionarse elementos reguladores específicos de tejido con la región codificadora para permitir la expresión específica de tejido del transgén. El ADN, en una disolución tamponada apropiada, se pone en una aguja de microinyección (que puede obtenerse por tubo capilar utilizando una pipet puller) y el huevo que se va a inyectar se pone en un portaobjetos con depresión. La aguja se inserta en el pronúcleo del huevo, y se inyecta la disolución de ADN. El huevo inyectado se transfiere al oviducto de un ratón pseudopreñado (un ratón estimulado con las hormonas apropiadas para mantener la gestación pero que no está realmente preñado), desde donde se va al útero, se implanta y se desarrolla a término. Como se ha indicado anteriormente, la microinyección no es el único método para insertar ADN en la célula del huevo y se utiliza aquí sólo para fines ejemplares.

Otra utilización de la secuencia del antígeno PSM es aislar un gen o genes homólogos en diferentes mamíferos. El gen o los genes pueden aislarse mediante cribado de baja astringencia bien de ADNc o de bibliotecas genómicas de diferentes mamíferos utilizando sondas de la secuencia de PSM. Los clones positivos identificados se analizarán adicionalmente mediante técnicas de secuenciación de ADN que son muy conocidas para el experto en la técnica. Por ejemplo, la detección de miembros de la familia de proteínas serina quinasa por sondeo de homología (18).

Esta invención proporciona una utilización de una molécula de ADN que codifica un antígeno de membrana específico de la próstata unido de manera operativa a un elemento regulador en posición 5' para la preparación de una composición farmacéutica para suprimir o modular la capacidad metastásica de las células del tumor de próstata, el crecimiento del tumor de próstata o eliminar las células del tumor de próstata, en la que dicha composición farmacéutica se introduce en las células de manera que la expresión del antígeno de membrana específico de la próstata está bajo el control del elemento regulador, suprimiendo o modulando así la capacidad metastásica de las células del tumor de próstata, el crecimiento del tumor de próstata o eliminando las células del tumor de próstata. El sujeto puede ser un mamífero o más específicamente un ser humano. En una realización, la molécula de ADN que codifica el antígeno de membrana específico de la próstata unido de manera operativa a un elemento regulador en posición 5' forma parte de un vector de transferencia que se inserta en una célula u organismo. Además, el vector es capaz de replicarse y expresar el antígeno de membrana específico de la próstata. La molécula de ADN que codifica el antígeno de membrana específico de la próstata puede integrarse en un genoma de una célula eucariota o procariota o en una célula anfitriona que contiene y/o expresa un antígeno de membrana específico de la próstata.

Además, la molécula de ADN que codifica un antígeno de membrana específico de la próstata puede introducirse mediante un vehículo bacteriano, viral, fúngico, animal o liposomal. También están disponibles otros medios y son conocidos por el experto en la técnica.

Además, la molécula de ADN que codifica un antígeno de membrana específico de la próstata unido de manera operativa a un promotor o amplificador. Se han descrito varios vectores virales incluyendo los construidos a partir de varios promotores y otros elementos reguladores obtenidos a partir de fuentes virales. Los promotores consisten en series cortas de secuencias de ácido nucleico que interactúan específicamente con proteínas celulares implicadas en la transcripción. La combinación de diferentes secuencias de reconocimiento y la concentración celular de los factores de transcripción conocidos determina la eficacia con la que un gen se transcribe en un tipo particular de célula.

## ES 2 276 390 T3

Los ejemplos de promotores adecuados incluyen un promotor viral. Los promotores virales incluyen: promotor de adenovirus, un promotor del virus simio 40 (SV40), un promotor del citomegalovirus (CMV), un promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV), un promotor del virus de la leucemia murina de Malony, un promotor del virus del sarcoma murino y un promotor del virus del sarcoma de Rous.

5

Además, otro promotor adecuado es un promotor de choque térmico. Además, un promotor adecuado es un promotor de bacteriófago. Los ejemplos de promotores de bacteriófagos adecuados incluyen, pero no están limitados a, promotor T7, promotor T3, promotor SP6, promotor lambda y promotor de baculovirus.

10

También es adecuado como promotor un promotor de células animales tales como un promotor de interferón, un promotor de metalotioneína, y un promotor de inmunoglobulina. Un promotor fúngico también es un promotor adecuado. Los ejemplos de promotores fúngicos incluyen, pero no están limitados a, un promotor ADC1, un promotor ARG, un promotor ADH, un promotor CYC1, un promotor CUP, un promotor ENO1, un promotor GAL, un promotor PHO, un promotor PGK, un promotor GAPDH, un promotor de factor tipo apareamiento. Además, también son adecuados los promotores de células de plantas y de células de insectos para los métodos descritos en la presente memoria.

15

Esta invención proporciona una utilización de una molécula de ADN que codifica un antígeno de membrana específico de la próstata unido de manera operativa a un elemento regulador en posición 5' acoplado con un ADN terapéutico para la preparación de una composición farmacéutica para suprimir o modular la capacidad metastásica de las células del tumor de próstata, el crecimiento del tumor de próstata o eliminar las células del tumor de próstata, en la que dicha composición farmacéutica se introduce en una célula tumoral de un sujeto, suprimiendo o modulando así la capacidad metastásica de las células del tumor de próstata, el crecimiento del tumor de próstata o eliminando las células del tumor de próstata. El sujeto puede ser un mamífero o más específicamente un ser humano.

25

Además, el ADN terapéutico que está acoplado a la molécula de ADN que codifica un antígeno de membrana específico de la próstata unido de manera operativa a un elemento regulador en posición 5' en una célula tumoral puede codificar una citoquina, antígeno viral, o una enzima que activa el profármaco. También están disponibles otros medios y son conocidos para el experto en la técnica.

30

La citoquina utilizada puede ser interleuquina-2, interleuquina-12, interferón alfa, beta o gamma, factor estimulante de las colonias granulocito-macrófago u otros factores inmunitarios.

35

Además, esta invención proporciona una célula tumoral de próstata que comprende una molécula de ADN aislada a partir de ácido nucleico de mamíferos que codifica un antígeno de membrana específico de la próstata de mamíferos bajo el control de un antígeno de membrana específico de la próstata unido de manera operativa a un elemento regulador en posición 5'.

40

Tal y como se utiliza en la presente memoria, las moléculas de ADN incluyen ADN complementario (ADNc), ADN sintético y ADN genómico.

45

Esta invención proporciona una vacuna terapéutica para prevenir el crecimiento del tumor de próstata humano o la estimulación de células tumorales de próstata en un sujeto. Dicha vacuna terapéutica y un vehículo aceptable desde un punto de vista farmacéutico pueden administrarse en una cantidad eficaz a la célula de la próstata, previniendo así el crecimiento del tumor o la estimulación de las células tumorales en el sujeto. También están disponibles otros medios y son conocidos para el experto en la técnica.

50

Esta invención proporciona un método para detectar células tumorales hematógenas micrometastásicas de un sujeto, que comprende (A) realizar la reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR) en muestras de sangre, médula ósea o nódulo linfático del sujeto utilizando los cebadores del antígeno de membrana específico de la próstata, y (B) verificar las micrometástasis mediante secuenciación de ADN y análisis Southern, detectando así células tumorales hematógenas micrometastásicas del sujeto. El sujeto puede ser un mamífero o más específicamente un ser humano.

55

La célula tumoral micrometastásica puede ser un cáncer de próstata y los cebadores de ADN pueden obtenerse a partir del antígeno específico de la próstata. Además, se puede administrar al sujeto simultáneamente una cantidad eficaz de hormonas con el fin de incrementar la expresión del antígeno de membrana específico de la próstata.

60

Esta invención proporciona una utilización de una molécula de ADN que codifica un antígeno de membrana específico de la próstata unido de manera operativa a un elemento regulador en posición 5' para la preparación de una composición farmacéutica para eliminar la respuesta mitogénica debida a la transferrina, en la que dicha composición farmacéutica se introduce en una célula tumoral, la expresión de cuyo gen está asociada directamente con un efecto patológico definido en un organismo multicelular, eliminando así la respuesta mitogénica debida a la transferrina. La célula tumoral puede ser una célula de la próstata.

65

## Detalles experimentales

### Primera Serie de Experimentos

#### 5 Materiales y Métodos

El método para clonar el gen implica la purificación del antígeno en grandes cantidades por inmunoprecipitación y la microsecuenciación de varios péptidos internos para utilizarlos para sintetizar cebadores de oligonucleótidos degenerados para su utilización posterior en la reacción en cadena de la polimerasa (19,20). Un ADNc parcial se amplió como un producto de PCR y se utilizó como una sonda homóloga para clonar la molécula de ADNc de longitud completa a partir de una biblioteca de plásmidos de ADNc de la línea celular LNCaP (Adenocarcinoma de Próstata) (8). Experimentos previos mostraron que el anticuerpo CYT-356 (9) no era capaz de detectar el antígeno producido en bacterias debido a que el epítipo era la parte glicosilada del antígeno PSM y esto necesitaba un método más difícil y complejo.

#### 15 *Análisis Western del Antígeno PSM*

Se aislaron proteínas de membrana a partir de células mediante lisis hipotónica seguida de centrifugación en un gradiente de densidad de sacarosa (21). Se sometieron a electroforesis 10-20  $\mu$ g de proteínas de membrana de LNCaP, DU-145 y PC-3 en un gel SDS-PAGE al 10% con un gel concentrador al 4% a 9-10 miliamperios durante 16-18 horas. Las proteínas se electrotransfirieron a membranas PVDF (Millipore® Corp.) en tampón de transferencia (48 mM Tris base, 39 mM Glicina, 20% Metanol) a 25 voltios toda la noche a 4°C. Las membranas se bloquearon en TSB (0,15 M NaCl, 0,01 M Tris base, 5% BSA) durante 30 minutos a temperatura ambiente seguido de incubación con 10-15  $\mu$ g/ml de anticuerpo monoclonal CYT-356 (Cytogen Corp.) durante 2 horas. Las membranas se incubaron con 10-15  $\mu$ g/ml de inmunoglobulina anti-ratón de conejo (Accurate Scientific) durante 1 hora a temperatura ambiente seguido de incubación con <sup>125</sup>I-Proteína A (Amersham®) a 1x10<sup>6</sup> cpm/ml a temperatura ambiente. Las membranas se lavaron y se sometieron a autorradiografía durante 12-24 horas a -70°C (Figura 1).

#### 30 *Análisis Inmunohistoquímico de la Expresión del Antígeno PSM*

Se utilizó el método avidina-biotina de detección inmunohistoquímica para analizar la expresión del Antígeno PSM tanto en secciones de tejido como en líneas celulares humanas (22). Se fijaron secciones de tejido de próstata cortadas con criostato (espesor de 4-6  $\mu$ m) en metanol/acetona durante 10 minutos. Se hicieron citocentrifugados de células en portaobjetos de vidrio utilizando 50.000 células/100  $\mu$ l/portaobjetos. Las muestras se trataron con 1% peróxido de hidrógeno en PBS durante 10-15 minutos con el fin de eliminar cualquier actividad peroxidasa endógena. Las secciones de tejido se lavaron varias veces en PBS, y se incubaron con el suero supresor apropiado durante 20 minutos. El suero supresor se eliminó y las secciones o células se incubaron con el anticuerpo monoclonal CYT-356 diluido durante 1 hora. Las muestras se lavaron con PBS y se incubaron secuencialmente con anticuerpos secundarios (inmunoglobulinas de caballo o cabra, dilución 1:200 durante 30 minutos) y con complejos avidina-biotina (dilución 1:25 durante 30 minutos). DaB se utilizó como cromógeno seguido de contratinción con hematoxilina y montaje. En cada experimento se utilizaron como controles secciones congeladas de muestras de próstata y citocentrifugados de células duplicados. Como control positivo, se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-citoqueratina CAM 5.2 siguiendo el mismo proceso descrito anteriormente. Se consideró que las secciones de tejido expresaban el antígeno PSM si al menos un 5% de las células demostraba inmunorreactividad. Nuestro sistema de puntuación es como sigue: 1 = <5%; 2 = 5-19%; 3 = 20-75%; y 4 = >75% de células positivas. La homogeneidad frente a la heterogeneidad se determinó evaluando las células positivas y negativas en 3-5 campos de microscopio óptico de alta potencia (400x), registrando el porcentaje de células positivas en 100-500 células. La intensidad de la inmunotinción se clasificó en una escala 1+ a 4+, en la que 1+ representa suave, 2-3+ representa moderada, y 4+ representa inmunotinción intensa respecto a los controles positivos.

#### 50 *Inmunoprecipitación del Antígeno PSM*

Células LNCaP confluentes en un 80% en placas de cultivo de 100 mm se mantuvieron en medio RPMI sin metionina durante 2 horas, después de las cuales se añadió <sup>35</sup>S-Metionina a 100  $\mu$ Ci/ml y las células se crecieron durante 16-18 horas más. Las células se lavaron y se lisaron mediante la adición de 1 ml de tampón de lisis (1% Triton X-100, 50 mM Hepes pH 7,5, 10% glicerol, 150 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM PSF y 1 mM EGTA) con incubación durante 20 minutos a 4°C. Los lisados se aclararon previamente mezclándolos con células Pansorbin® (Calbiochem®) durante 90 minutos a 4°C. Los lisados celulares se mezclaron con lechos de Proteína A Sefarosa® CL-4B (Pharmacia®) unidos previamente a anticuerpo CYT-356 (Cytogen Corp.) y anticuerpo RAM (Accurate Scientific) durante 3-4 horas a 4°C. Se utilizaron 12  $\mu$ g de anticuerpo por 3 mg de lechos por placa de cultivo. Los lechos se lavaron con tampón HNTG (20 mM Hepes pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, 10% glicerol y 2 mM Ortovanadato de Sodio), se resuspendieron en tampón de carga de la muestra que contiene  $\beta$ -mercaptoetanol, se desnaturalizaron a 95°C durante 5-10 minutos y se corrieron en un gel SDS-PAGE al 10% con un gel concentrador al 4% a 10 miliamperios toda la noche. Los geles se tiñeron con Azul de Coomassie, se destiñeron con ácido acético/metanol y se secaron en un secador de vacío a 60°C. Los geles se autorradiografiaron durante 16-24 horas a -70°C (Figura 2 A-D).

## ES 2 276 390 T3

### *Inmunoprecipitación a Gran Escala y Secuenciación Peptídica*

El proceso descrito anteriormente para la inmunoprecipitación se repitió con 8 placas de cultivo confluentes que contienen aproximadamente  $6 \times 10^7$  células LNCaP. El producto de la inmunoprecipitación se reunió y se cargó en dos carriles de un gel SDS-PAGE al 10% y se sometió a electroforesis a 9-10 miliamperios durante 16 horas. Las proteínas se electrotransfirieron a membranas de Nitrocelulosa BA-85 (Scheleicher y Schuell®) durante 2 horas a 75 voltios a 4°C en tampón de transferencia. Las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau para visualizar las proteínas y se cortó la banda de proteína de 100 kD, se solubilizó y se digirió proteolíticamente con tripsina. Se realizó HPLC en la muestra digerida en un Applied Biosystems Modelo 171C y los picos peptídicos claramente dominantes se seleccionaron y se secuenciaron mediante degradación de Edman modificada en un Microsecuenciador Proteína/Péptido Applied Biosystems Modelo 477A modificado (23). Los datos de secuenciación de todos los péptidos están incluidos en este documento. Intentamos secuenciar el extremo amino terminal del antígeno PSM mediante un método similar que implicaba purificar el antígeno mediante inmunoprecipitación y transferir mediante electrotransferencia a una membrana PVDF (Millipore®). Se analizó la proteína en un Secuenciador Proteína/Péptido Applied Biosystems Modelo 477A y se vio que el extremo amino terminal estaba *bloqueado* y, por lo tanto, no se pudo obtener ningún dato de la secuencia mediante esta técnica.

#### Secuencias Peptídicas del Antígeno PSM:

2T17 #5 SLYES(W)TK (SEQ ID No.3)  
2T22 #9 (S)YPDGXNLPGG(g)VQR (SEQ ID No. 4)  
2T26 #3 FYDPMFK (SEQ ID No. 5)  
2T27 #4 IYNVIGTL(K) (SEQ ID No. 6)  
2T34#6 FLYXXTQIPHLAGTEQNFQLAK (SEQ ID No. 7)  
2T35 #2 G/PVILYSDPADYFAPD/GVK (SEQ ID No. 8,9)  
2T38 #1 AFIDPLGLPDRPFYR (SEQ ID No. 10)  
2T46#8 YAGESFPGIYDALFDIESK (SEQ ID No. 11)  
2T47 #7 TILFAS(W)DAEEFGXX(q)STE(e)A(E)..(SEQ ID No. 12)

Notas: X significa que no se pudo identificar ningún resto en esa posición. Mayúscula indica identificación pero con un nivel de confianza menor. (letra minúscula) significa resto presente pero en niveles muy bajos...indica que la secuencia continúa pero que está por debajo del límite de detección.

Se verificó que todas estas secuencias peptídicas eran únicas después de una investigación de homología completa de la base de datos informática GenBank traducida.

#### PCR Degenerada

Se sintetizaron cebadores de oligonucleótidos con sentido y antisentido degenerados no fosforilados en posición 5' de 17 a 20 nucleótidos de longitud correspondientes a partes de los péptidos anteriores en un Sintetizador Applied Biosystems Modelo 394A. Estos cebadores tienen de 32 a 144 degeneraciones. Los cebadores utilizados se muestran a continuación. Los aminoácidos subrayados en los péptidos representan los restos utilizados en el diseño de los cebadores.

#### Péptido 3: FYDPMFK (SEQ ID No. 5)

Cebador PSM "A" TT(C o T)-TA(C o T)-GA(C o T)-CCX-ATG-TT (SEQ ID No. 13)  
Cebador PSM "B" AAC-ATX-GG(A o G)-TC(A o G)-TA(A o G)-AA (SEQ ID No. 14)

El cebador A es un cebador con sentido y el B es anti-sentido. La degeneración es 32 veces.

#### Péptido 4: IYNVIGTL(K) (SEQ ID No. 6)

Cebador PSM "C" AT(T o C o A)-TA(T o C)-AA(T o C) GTX-AT(T o C o A)-GG (SEQ ID No. 15)  
Cebador PSM "D" CC (A o T o G)-ATX-AC (G o A)-TT (A o G)-TA (A o G o T)-AT (SEQ ID No. 16)

El cebador C es un cebador con sentido y el D es anti-sentido. La degeneración es 144 veces.

## ES 2 276 390 T3

Péptido 2: G/PVILYSDPADYFAPD/GVK (SEQ ID No. 8,9)

Cebador PSM "E" CCX-GCX-GA(T o C)-TA(T o C)-TT(T o C)-GC (SEQ ID No. 17)

Cebador PSM "F" GC(G o A)-AA(A o G)-TA(A o G)-TXC-GCX-GG (SEQ ID No. 18)

El cebador E es un cebador con sentido y el F es un cebador anti-sentido. La degeneración es 128 veces.

Péptido 6: FLYXXTQIPHLAGTEONFOLAK (SEQ ID No. 7)

Cebador PSM "I" ACX-GA(A o G)-CA(A o G)-AA (T o C)-TT(T o C)-CA(A o G)-CT (SEQ ID No. 19)

Cebador PSM "J" AG-(T o C)TG-(A o G)AA-(A o G)TT-(T o C) TG-(T o C) TC-XGT (SEQ ID No. 20)

Cebador PSM "K" GA(A o G)-CA (A o G)-AA (T o C)-TT(T o C) CA(A o G)-CT (SEQ ID No. 21)

Cebador PSM "L" AG-(T o C)TG-(A o G)AA-(A o G)TT-(T o C)TG-(T o C)TC (SEQ ID No. 22)

Los cebadores I y K son cebadores con sentido y J y L son anti-sentido. I y J tienen degeneraciones de 128 veces y K y L tienen una degeneración de 32 veces.

Péptido 7: TILFAS(W)DAEEFGXX(q)STE(e)A(E)... (SEQ ID No. 12)

Cebador PSM "M" TGG-GA(T o C)-GCX-GA(A o G)-GA(A o G)-TT(C o T)-GG (SEQ ID No. 23)

Cebador PSM "N" CC-(G o A)AA-(T o C)TC-(T o C)TC-XGC-(A o G)TC-CCA (SEQ ID No. 24)

Cebador PSM "O" TGG-GA(T o C)-GCX-GA(A o G)-GA(A o G)-TT (SEQ ID No. 25)

Cebador PSM "P" AA-(T o C)TC-(T o C)TC-XGC-(A o G)TC-CCA (SEQ ID No. 26)

Los cebadores M y O son cebadores con sentido y N y P son anti-sentido. M y N tienen degeneraciones de 64 veces y O y P tienen una degeneración de 32 veces.

Se realizó PCR degenerada utilizando un ciclador térmico de ADN Perkin-Elmer Modelo 480. Se preparó el molde de ADNc para PCR a partir de ARNm de LNCaP que se aisló mediante métodos estándar de cromatografía en oligo dT (Collaborative Research). La síntesis de ADNc se llevó a cabo como sigue:

4,5 µl LNCap poli A + ARN (2 µg)

1,0 µl Cebadores oligo dT (0,5 µg)

4,5 µl dH<sub>2</sub>O

10 µl

Incubar a 68°C x 10 minutos.

Enfriar rápidamente en hielo x 5 minutos.

Añadir:

4 µl 5x Tampón RT

2 µl 0,1 M DTT

1 µl 10 mM dNTS

0,5 µl RNasina (Promega)

1,5 µl dH<sub>2</sub>O

19 µl

## ES 2 276 390 T3

Incubar durante 2 minutos a 37°C.

Añadir 1  $\mu$ l de Transcriptasa Inversa Superscript® (Gibco®-BRL)

5 Incubar durante 1 hora a 37°C.

Añadir 30  $\mu$ l de dH<sub>2</sub>O.

10 Utilizar 2  $\mu$ l por reacción de PCR.

Las reacciones de PCR degenerada se optimizaron variando las temperaturas de hibridación, las concentraciones de Mg<sup>++</sup>, concentraciones de cebador, composición del tampón, tiempos de extensión y número de ciclos. Nuestro perfil del ciclador térmico óptimo fue: Desnaturalización a 94°C x 30 segundos, Hibridación a 45-55°C durante 1 minuto (dependiendo de la T<sub>m</sub> media de los cebadores utilizados) y Extensión a 72°C durante 2 minutos.

15 5  $\mu$ l 10 x Tampón PCR\*

5  $\mu$ l 2,5 mM mezcla de dNTP

20 5  $\mu$ l Mezcla de Cebadores (que contiene 0,5-1,0  $\mu$ g de cada cebador con sentido y anti-sentido)

5  $\mu$ l 100 mM  $\beta$ -mercaptoetanol

25 2  $\mu$ l molde ADNc de LNCaP

5  $\mu$ l 25 mM MgCl<sub>2</sub> (2,5 mM final)

21  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O

30 2  $\mu$ l Polimerasa Taq diluida (0,5 U/ $\mu$ l)

### **50 $\mu$ l volumen total**

35 Los tubos se cubrieron con 60  $\mu$ l de aceite mineral ligero y se amplificaron durante 30 ciclos. Los productos de PCR se analizaron sometiendo a electroforesis 5  $\mu$ l de cada muestra en un gel de agarosa al 2-3% seguido de tinción con bromuro de etidio y fotografía.

### \*10 x Tampón PCR

40 166 mM NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>

670 mM Tris, pH 8,8

45 2 mg/ml BSA

En la Figura 5 se muestran fotografías representativas que muestran productos de PCR.

### *Clonación de los Productos de PCR*

50 Con el fin de analizar adicionalmente estos productos de PCR, estos productos se clonaron en un vector plasmídico adecuado utilizando "Clonación TA" (Invitrogen® Corp.). La estrategia de clonación utilizada aquí es ligar directamente los productos de PCR en un vector plasmídico que posee restos T protuberantes en el sitio de inserción, explotando el hecho de que la polimerasa Taq deja restos A protuberantes en los extremos de los productos de PCR. Las mezclas de ligación se transforman en células *E. coli* competentes y las colonias resultantes se crecen, se aísla el ADN plasmídico mediante el método de lisis alcalina (24) y se criban mediante análisis de restricción (Figura 6 A-B).

### *Secuenciación del ADN de los Productos de PCR*

60 Los clones TA de los productos de PCR se secuenciaron mediante el método dideoxi (25) utilizando Secuencasa (U.S. Biochemical). Se desnaturalizaron 3-4  $\mu$ g de cada ADN plasmídico con NaOH y se precipitaron con etanol. Las reacciones de marcaje se llevaron a cabo según las recomendaciones del fabricante utilizando <sup>35</sup>S-ATP y las reacciones se terminaron según el mismo protocolo. Los productos de la secuenciación se analizaron en geles de 6% poliacrilamida/7M Urea utilizando un equipo de secuenciación IBI. Los geles se corrieron a 120 vatios durante 2 horas. Después de la electroforesis, los geles se fijaron durante 15-20 minutos en 10% metanol/10% ácido acético, se transfirieron a papel Whatman 3MM y se secaron en un secador de vacío Biorad® a 80°C durante 2 horas. Los geles se autorradiografiaron a temperatura ambiente durante 16-24 horas. Con el fin de determinar si los productos de PCR eran los clones correctos, analizamos las secuencias obtenidas en los extremos 5' y 3' de las moléculas buscando las

## ES 2 276 390 T3

secuencias de cebadores correctas, así como secuencias adyacentes que correspondían a las partes de los péptidos no utilizadas en el diseño de los cebadores.

5 Se confirmó que IN-20 era correcto y representa un ADNc parcial del gen de PSM. En esta reacción de PCR, se utilizaron los cebadores I y N. La secuencia de ADN que obtuvimos leyendo desde el cebador I fue:

**ACG GAG CAA AAC TTT CAG CTT GCA AAG** (SEQ ID No. 30)

**TEQNFOLAK** (SEQ ID No. 31)

10

Los aminoácidos subrayados eran la parte del péptido 6 que se utilizó para diseñar este cebador con sentido y los demás aminoácidos que coinciden con los presentes en nuestro péptido confirman que este extremo de la molécula representa la proteína correcta (antígeno PSM).

15 Cuando analizamos el otro extremo de la molécula leyendo desde el cebador N, la secuencia fue:

**CTC TTC GGC ATC CCA GCT TGC AAA CAA AAT TGT TCT** (SEQ ID No. 32)

20 Debido a que ésta representa la secuencia de ADN anti-sentido, se necesita mostrar la secuencia con sentido complementaria con el fin de encontrar nuestro péptido.

Secuencia con Sentido:

**AGA ACA ATT TTG TTT GCA AGC TGG GAT GCC AAG GAG** (SEQ ID No. 33)

25

**RTILFASWDAEE** (SEQ ID No. 34)

30 Los aminoácidos subrayados aquí representan la parte del péptido 7 utilizada para crear el cebador N. Todos los aminoácidos en posición 5' respecto a este cebador son correctos en el clon IN-20, conforme con los aminoácidos encontrados en el péptido 7. La secuenciación de ADN adicional nos permitió identificar la presencia de nuestros demás péptidos PSM en la secuencia de ADN de nuestro clon positivo.

*Se vio que la secuencia de ADN de este ADNc parcial era única cuando se cribó la base de datos informatizada GenBank.*

35

*Construcción de la Biblioteca de ADNc y Clonación de ADNc de PSM de Longitud Completa*

40 Se construyó una biblioteca de ADNc a partir de ARNm de LNCaP utilizando el sistema de plásmido Superscript® (BRL®-Gibco). La biblioteca se transformó utilizando células DH5- $\alpha$  competentes y se plaquearon en placas de 100 mm que contienen LB más 100  $\mu$ g/ml de Carbenicilina. Las placas se crecieron toda la noche a 37°C y las colonias se transfirieron a filtros de nitrocelulosa. Los filtros se procesaron y se cribaron según Grunstein y Hogness (26), utilizando nuestra sonda homóloga de ADNc parcial de 1,1 kb que se marcó radiactivamente con <sup>32</sup>P-dCTP mediante cebado aleatorio (27). Se obtuvieron ocho colonias positivas que después de análisis de restricción y secuenciación de ADN se vio que representaban moléculas de ADNc de longitud completa que codifican el antígeno PSM. En la

45 Figura 7 se muestra un autorradiograma que muestra el tamaño de las moléculas de ADNc representadas en nuestra biblioteca y en la Figura 8 se muestra los análisis de restricción de varios clones de longitud completa. La Figura 9 es un análisis Southern plasmídico de las muestras de la Figura 8, que muestra que todas hibridan con la sonda de ADNc parcial de 1,1 kb.

50 Tanto el ADNc como el antígeno se cribaron en la base de datos GenBank (Proyecto del Genoma Humano) y se vio que eran únicas.

*Análisis Northern de la Expresión Génica de PSM*

55 Los análisis Northern (28) del gen de PSM han mostrado que la expresión está limitada a la próstata y al carcinoma de próstata.

60 Se desnaturalizaron muestras de ARN (bien 10  $\mu$ g de ARN total ó 2  $\mu$ g de poli A+ARN) y se sometieron a electroforesis en geles de 1,1% agarosa/formaldehído a 60 miliamperios durante 6-8 horas. El ARN se transfirió a membranas de nilón Nytran® (Schleicher y Schuell®) mediante transferencia por presión en 10 x SSC con un Posi-blotter (Stratagene®). El ARN se entrecruzó con las membranas utilizando un Stratalinker (Stratagene®) y posteriormente se introdujeron en un horno a vacío a 80°C durante 2 horas. Las transferencias se pre-hibridaron a 65°C durante 2 horas en disolución de prehibridación (BRL®) y posteriormente se hibridaron durante 16 horas en tampón de hibridación (BRL®) que contiene 1-2 x 10<sup>6</sup> cpm/ml de sonda de ADNc cebada aleatoriamente marcada con <sup>32</sup>P. Las membranas

65 se lavaron dos veces en 1 x SSPE/1% SDS y dos veces en 0,1 x SSPE/1% SDS a 42°C. Las membranas se secaron al aire y se autorradiografiaron durante 12-36 horas a -70°C.

## ES 2 276 390 T3

### *Análisis por PCR de la Expresión Génica de PSM en Tejidos de Próstata Humanos*

La PCR se realizó en 15 muestras de próstata humana para determinar la expresión génica de PSM. Se utilizaron cinco muestras de tejido de próstata normal, de hiperplasia prostática benigna y de cáncer de próstata (histología confirmada por MSKCC Pathology Department).

Se transcribieron inversamente 10  $\mu$ g de ARN total de cada muestra para obtener molde de ADNc como se ha descrito previamente en la sección IV. Los cebadores utilizados correspondían a los extremos 5' y 3' de nuestro ADNc parcial de 1,1 kb, IN-20, y por lo tanto el tamaño esperado de la banda amplificada es 1,1 kb. Debido a que la  $T_m$  de nuestros cebadores es 64°C hibridamos los cebadores en nuestra PCR a 60°C. La PCR se llevó a cabo durante 35 ciclos utilizando las mismas condiciones que las descritas previamente en la sección IV.

Se incluyeron como control positivo LNCaP y H26 -LNCaP transfectada con Ras (29) y DU-145 como control negativo. 14/15 muestras amplificaron claramente la banda de 1,1 kb y por lo tanto expresan el gen.

### *Resultados Experimentales*

Se ha identificado el gen que codifica el antígeno PSM de 100 kD. La secuencia de ADNc completa se muestra en la Secuencia ID #1. Debajo de esta secuencia de ácido nucleico está la secuencia de aminoácidos traducida predicha. El número total de aminoácidos es 750, ID #2. La hidrofiliidad de la secuencia proteica predicha se muestra en la Figura 16. En la Figura 17 se muestran tres péptidos con el mayor punto de hidrofiliidad. Son: Asp-Glu-Leu-Lys-Ala-Glu (SEQ ID No. 35); Asn-Glu-Asp-Gly-Asn-Glu (SEQ ID No. 36) y Lys-Ser-Pro-Asp-Glu-Gly (SEQ ID No. 37).

Mediante el método de Klein, Kanehisa y DeLisi, se identificó un dominio de membrana específico. La secuencia es desde el aminoácido #19 hasta el aminoácido #44: Ala-Gly-Ala-Leu-Val-Leu-Ala-Gly-Gly-Phe-Phe-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Phe (SEQ ID No. 38).

Este dominio de membrana predicho se procesó en PC Gene (programa informático). Estos datos permiten la predicción de dominios de membrana externos e internos del antígeno PSM que ayudan en el diseño de anticuerpos para utilizarse en la selección y obtención de imágenes del cáncer de próstata.

Cuando la secuencia del antígeno PSM se comparó con otras secuencias conocidas del GeneBank, se vio homología entre la secuencia del antígeno PSM y la secuencia del receptor de la transferrina. Los datos se muestran en la Figura 18.

### *Discusiones Experimentales*

#### Utilizaciones Potenciales del Antígeno PSM:

##### 1. *Detección de tumores*

###### Microscópico:

La designación sin ambigüedad de tumores puede lograrse mediante la utilización de sondas para diferentes antígenos. En el caso del cáncer de próstata, puede resultar beneficiosa la sonda del antígeno PSM. Por lo tanto, PSM puede utilizarse para fines diagnósticos y esto se podría conseguir a nivel microscópico mediante hibridación *in situ* utilizando sondas con sentido (control) y antisentido obtenidas de la región codificadora del ADNc clonado por los solicitantes. Esto podría utilizarse para evaluar la extensión extraprostática local, implicación de nódulo linfático, hueso u otros sitios metastásicos. Debido a que la metástasis de hueso presenta un problema importante en el cáncer de próstata, la detección temprana de la diseminación metastásica se requiere especialmente para la determinación del estadio. En algunos tumores la detección de células tumorales en la médula ósea presagia un pronóstico severo y sugiere que deben intentarse intervenciones dirigidas a la metástasis. La detección de la expresión del antígeno PSM en aspirados o secciones de médula ósea puede proporcionar dicha información temprana. Puede utilizarse la amplificación por PCR o la hibridación *in situ*. Esto podría desarrollarse para cualquier posible región metastásica.

##### 2. *Identificación del sitio antigénico*

El conocimiento del ADNc del antígeno también proporciona la identificación de áreas que servirán como buenos antígenos para el desarrollo de anticuerpos para utilizarse frente a secuencias de aminoácidos específicas del antígeno. Dichas secuencias pueden estar en diferentes regiones tales como en el exterior, en la membrana o en el interior del antígeno PSM. El desarrollo de estos anticuerpos específicos proporcionará la identificación inmunohistoquímica del antígeno. Estos anticuerpos obtenidos podrían desarrollarse para ser utilizados, especialmente los que funcionan en secciones fijadas en parafina así como en secciones congeladas debido a que serán los más útiles en inmunodiagnóstico.

### 3. Polimorfismo de longitud del fragmento de restricción y ADN genómico

Se ha visto que los polimorfismos de longitud del fragmento de restricción (RFLPS) son útiles para documentar la progresión del daño genético que se produce durante el inicio y la promoción del tumor. Puede ser que el análisis de RFLP demuestre que cambios en el mapeo de restricción de la secuencia de PSM pueden proporcionar evidencia de predisposición al riesgo o potencial maligno o progresión del tumor de próstata.

Dependiendo de la localización cromosómica del antígeno PSM, el gen del antígeno PSM puede servir como un marcador de localización cromosómica útil para el análisis cromosómico.

### 4. Suero

Con el desarrollo de anticuerpos específicos del antígeno, si el antígeno o los fragmentos seleccionados del antígeno aparecen en el suero pueden proporcionar un marcador sérico para detectar la presencia de enfermedad metastásica y pueden ser útiles individualmente o en combinación con otros marcadores específicos de la próstata.

### 5. Obtención de Imágenes

Debido a que la secuencia de ADNc implica que el antígeno tiene las características de una proteína que se extiende en la membrana con la mayoría de la proteína en la superficie exofacial, los anticuerpos, especialmente los anticuerpos monoclonales frente a los fragmentos peptídicos expuestos y específicos del tumor pueden proporcionar la obtención de imágenes del tumor de la extensión local del tumor metastásico o del tumor residual después de prostatectomía o irradiación. El conocimiento de la región codificadora permite la generación de anticuerpos monoclonales y éstos pueden utilizarse en combinación para proporcionar una obtención de imágenes máxima. Debido a que el antígeno comparte una similitud con el receptor de la transferrina tomando como base los análisis de ADNc (aproximadamente 54%), puede ser que exista un ligando normal específico para este antígeno y que la identificación del o de los ligandos proporcione otros medios para la obtención de imágenes.

### 6. Aislamiento de ligandos

El antígeno PSM puede utilizarse para aislar el o los ligandos normales que se unen a él. Este o estos ligandos dependiendo de la especificidad pueden utilizarse para seleccionar la diana o sus niveles séricos pueden predecir el estado de la enfermedad. Si se observa que el ligando normal para PSM es una molécula transportadora puede ser que PSM pueda utilizarse para unirse a ese ligando para fines terapéuticos (como una sustancia quelante de hierro) para ayudar en la eliminación del ligando de la circulación. Si el ligando estimula el crecimiento o la metástasis del tumor la administración del antígeno PSM soluble evitará la unión del ligando a la próstata. El conocimiento de la estructura del antígeno PSM podría dar lugar a la generación de un fragmento pequeño que se una al ligando que podría servir para el mismo fin.

### 7. Utilizaciones terapéuticas

a) Ligandos. El conocimiento de que la estructura del ADNc del antígeno PSM comparte homología estructural con el receptor de la transferrina (54% a nivel del ácido nucleico) implica que puede existir un ligando endógeno para el receptor que puede o no ser semejante a la transferrina. Se piensa que la transferrina es un ligando que transporta el hierro a las células después de unirse al receptor de la transferrina. Sin embargo, se ha publicado que la apotransferrina es un factor de crecimiento para algunas células que expresan el receptor de la transferrina (30). Permanece por determinar si la transferrina es un ligando para este antígeno o si algún otro ligando se une a este ligando. Si se identifica un ligando, éste puede transportar una sustancia específica tal como un ion metálico (hierro o cinc u otro) al tumor y servir así como un medio para transportar sustancias tóxicas (productos químicos radiactivos o citotóxicos, es decir, toxinas como ricina o agente alquilante citotóxico o profármaco citotóxico) al tumor.

El principal sitio metastásico para el tumor de próstata es el hueso. El hueso y el estroma del hueso son ricos en transferrina. Estudios recientes sugieren que este microentorno es lo que proporciona el "terreno" correcto para la metástasis prostática en el hueso (31). Puede ser que esto estimule también la unión por lo que estos factores que reducen esta capacidad pueden disminuir la metástasis prostática en el hueso y el crecimiento de la metástasis prostática en el hueso.

Se ha visto que el ligando para el antígeno nuevo (que se piensa que es un oncogén y marcador del fenotipo maligno en carcinoma de mama) servía para inducir la diferenciación de células de cáncer de mama y, por lo tanto, podría servir como un tratamiento en lugar de un promotor de la enfermedad. Puede ser que la unión del ligando a la región correcta de PSM, ya sea un ligando natural o un anticuerpo, pueda tener una función similar.

Los anticuerpos frente al antígeno PSM acoplados con un agente citotóxico serán útiles para eliminar las células del cáncer de próstata. Los conjugados de los anticuerpos frente al receptor de la transferrina con toxinas son citotóxicos para varias células tumorales ya que las células tumorales tienden a expresar unos niveles incrementados del receptor de la transferrina (32). Los receptores de la transferrina internalizan moléculas en las células por endocitosis. Las combinaciones de anticuerpo y fármaco pueden ser tóxicas. La transferrina unida a una toxina puede ser tóxica.

b) Los anticuerpos frente al antígeno PSM acoplados con un agente citotóxico serán útiles para eliminar las células del cáncer de próstata. El agente citotóxico puede ser un radioisótopo o una toxina como se conoce en la técnica. La unión del anticuerpo y la toxina o radioisótopo puede ser química. Los ejemplos de toxinas unidas directamente son doxorubicina, clorambucil, ricina, exotoxina de pseudomonas, etc., o puede generarse una toxina híbrida la mitad con especificidad para PSM y la otra mitad con especificidad para la toxina. Dicha molécula bivalente puede servir para unirse al tumor y la otra mitad para transportar un citotóxico al tumor o para unirse y activar un linfocito citotóxico tal como unión al complejo de receptor T<sub>1</sub>-T<sub>3</sub>. Los anticuerpos con la especificidad requerida también pueden clonarse en células T reemplazando el dominio de inmunoglobulina del receptor de la célula T (TcR); clonando en las cadenas pesadas y ligeras del Mab deseado; cortando y empalmado los segmentos génicos U<sub>h</sub> y U<sub>L</sub> con las regiones constantes de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR y transfectando estos genes quiméricos Ab/TcR en las células T de los pacientes, propagando estas células híbridas e infundiéndolas al paciente (33). El conocimiento específico de antígenos específicos de tejido para diana y generación de Mab específicos para dichas dianas ayudará a hacer utilizable este método. Debido a que la región codificadora del antígeno PSM proporciona un conocimiento de la región codificadora completa, es posible generar varios anticuerpos que podrían utilizarse en combinación para conseguir una acción antitumoral aditiva o sinérgica. Los anticuerpos pueden unirse a enzimas que pueden activar profármacos no tóxicos en su sitio del tumor tales como Ab-carboxipeptidasa y ácido 4-(bis(2-cloroetil)amino)benzoil- $\alpha$  glutámico y su fármaco precursor activo en ratones (34).

Es posible producir una quimera genética tóxica tal como TP-40 un recombinante genético que posee el ADNc de TGF-alfa y la parte tóxica de la exotoxina de pseudomonas de manera que TGF y la parte del híbrido se une al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y la parte de pseudomonas se internaliza en la célula enzimáticamente e inactiva la capacidad de los ribosomas de llevar a cabo la síntesis de proteínas lo que resulta en la muerte celular. Cuando conozcamos el ligando para el antígeno PSM podremos hacer lo mismo.

Además, una vez que se haya identificado el ligando para el antígeno PSM, la toxina puede conjugarse químicamente con los ligandos. Dichos ligandos conjugados pueden ser útiles desde un punto de vista terapéutico. Los ejemplos de toxinas son daunomicina, clorambucil, ricina, exotoxina de pseudomonas, etc. Alternativamente, se puede crear una construcción quimérica uniendo el ADNc del ligando con el ADNc de la toxina. Un ejemplo de dicha toxina es TGF $\alpha$  y exotoxina de pseudomonas (35).

#### 8. Otros

El antígeno PSM puede tener otras utilizaciones. Se sabe que la próstata es rica en cinc. Si el antígeno proporciona una función relacionada con esto u otra función biológica, el antígeno PSM puede ser útil en el tratamiento de otras patologías de la próstata tales como crecimiento hiperplásico benigno y/o prostatitis.

Debido a que puede generarse el antígeno PSM purificado, el antígeno PSM purificado puede unirse a lechos y utilizarse como una purificación "de afinidad" estándar. Puede utilizarse suero, orina u otras muestras biológicas para incubarlas con el antígeno PSM unido a los lechos. Los lechos pueden lavarse concienzudamente y eluirse con un gradiente de sal o de pH. El material eluido se purifica mediante gel SDS y se utiliza como una muestra para microsecuenciación. Las secuencias se compararán con otras proteínas conocidas y si son únicas, se puede utilizar la técnica de PCR degenerada para obtener el ligando. Una vez conocido, se determinará la afinidad del ligando mediante protocolos estándar (15).

#### 45 Referencias de la Primera Serie de Experimentos

1. Chiaroda, A, (1991) National roundtable of prostate cancer research directions. *Cancer Res.* 51: 2498-2505.
2. Coffey, D.S, Prostate Cancer- An overview of an increasing dilemma- *Cancer Supplement*, 71,3: 880-888, 1993.
3. Warner, J.A, et al., (1991) Future developments of non-hormonal systemic therapy for prostatic carcinoma. *Urologic Clin. North Amer.* 18:25-33.
4. Nguyen, L. et al., (1990) Prostatic acid phosphatase in the serum of cancer patients with prostatic cancer is a specific phosphotyrosine acid phosphatase. *Clin. Chem.* 35:1450-1455
5. Henttu, P., et al (1989) cDNA coding for the entire human prostate specific antigen show high homologies to the human tissue kallikrein genes. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* 160:903-908.
6. Yong, CY-F, et al, (1991) Hormonal regulation of prostate-specific antigen messenger RNA in human prostatic adenocarcinoma cell line LNCaP. *Cancer Res.* 51:3748-3752.
7. Liotta, L.A. (1986) Tumor invasion and metastases: role of the extracellular matrix. *Cancer Res.* 46:1-7.
8. Horoszewicz, J.S., et al. (1987) Monoclonal antibodies to a new antigenic marker in epithelial prostatic cells and serum of prostatic cancer patients. *Anticancer Res.* 7:927-936.
9. Horoszewicz, J.S., et al. (1983) LNCaP model human prostatic carcinoma. *Cancer Res.*, 43. 1809-1818.

## ES 2 276 390 T3

10. **Lopes, D., et al.** (1990) Immunohistochemical and pharmacokinetic characterization of the site-specific Immunoconjugate CYT-356, derived from anti-prostate monoclonal antibody 7E11-C5. *Cancer Res.*, 50:6423-6429.
11. **Wright, Jr., et al.** (1990) Characterization of a new carcinoma associated marker: 7E11-C5. *Antibod. Immunconj. Radiopharm.* 3:(abst#193).
12. **Feng, Q., et al.** (1991) Purification and biochemical characterization of the 7E11-C5 prostate carcinoma associated antigen. *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* 32:239,
13. **Axelrod, H.R., et al.** Preclinical results and human immunohistochemical studies with <sup>90</sup>Y-CYT-356. A New prostate cancer agent. *Abstract* 596. AUA 87th Annual Meeting, **10-14 Mayo, 1992. Washington, D.C.**
14. **Maniatis T., et al** (1982) *Molecular Cloning*; Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 197-98(1982).
15. **Maniatis, et al.** (1982) *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory.
16. *Methods in Enzymology* vol. 34:1-810, 1974 (E) B. **Jacoby** y I M. **Wilchek** Academic Pres, **Nueva York, 1974.**
17. **Hogan B., et al.** (1966) *Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory.
18. **Capecchi M.R.** *Science* (1989) 244:1288-1292; **Zimmer, A. y Gruss. P.** (1989) *Nature* 338:150-153.
19. **Trowbridge, I.S.,** (1982) Prospects for the clinical use of cytotoxic monoclonal antibodies conjugates in the treatment of cancer. *Cancer Surveys* 1:543-556.
20. **Hank, S.K** (1987) Homology probing: Identification of cDNA clones encoding members of the protein-serine kinase family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:388-392.
21. **Lee, C.C., et al.,** (1988) Generation of cDNA probes directed by amino acid sequences: cloning of urate oxidase. *Science*, 239, 1288.
22. **Girgis, S.I et al.** (1986) Generation of DNA probes for peptides with highly degenerate codons using mixed primer PCR, *Nucleic Acids Res.* 16:10932.
23. **Kartner, N., et al.** (1977) Isolation of plasma membranes from human skin fibroblasts. *J. Membrane Biology*, 36:191-211.
24. **Hsu, S.M., et al** (1981) Comparative study of the immunoperoxidase, anti-peroxidase, and avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am. J. Pathology*, 75:734.
25. **Tempst, P., et al.**(1989) Examination of automated polypeptide sequencing using standard phenylisothiocyanate reagent and subpicomole high performance liquid chromatography analysis. *Analytical Biochem.* 183:290-300.
26. **Bimbolm, H.C.** (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Meth. Enzymol*, 100: 243-255.
27. **Sanger, F., et al** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467.
28. **Grunstein. M., et al** (1975) Colony hybridization as a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72:3961.
29. **Feinberg, A.P., et al.** (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem*, 132, 6.
30. **Rave, N, et al.** (1979) Identification of procollagen mRNAs transferred to diazobenzylomethyl paper from formaldehyde gels. *Nucleic Acids Research*, 6:3559.
31. **Voeller. H.J., et al.** (1991) v-ras<sup>H</sup> expression confers hormone-independent *in-vitro* growth to LNCaP prostate carcinoma cells. *Molec. Endocrinology.* Vol. 5. No. 2, 209-216.
32. **Sirbasku, D.A.** (1991) Purification of an equine apotransferrin variant (thyromedin) essential for thyroid hormone dependent growth of GH<sub>1</sub>, rat pituitary tumor cells in chemically defined culture. *Biochem.*, 30:295-301.
33. **Rossi, M.C.** (1992) Selective stimulation of prostatic carcinoma cell proliferation by transferrin. *Proc, Natl Acad. Sci (USA)* 89:6197-6201.

34. **Eshhan, Z.** (1990) Chimeric T cell receptor which incorporates the anti-tumor specificity of a monoclonal antibody with the cytolytic activity of T cells: a model system for immunotherapeutic approach. *B. J. Cancer* 62:27-29.

5 35. **Antonie, P.** (1990) Disposition of the prodrug 4-(bis(2 chloroethyl)amino)benzoyl- $\alpha$ -glutamic acid and its active parent in mice. *B. J. Cancer* 62:905-914.

36. **Heimbrook, D.C., et al.** (1990) Transforming growth factor alpha-pseudomonas exotoxin fusion protein prolongs survival of nude mice bearing tumor xenografts. *Proc. Natl Acad. Sci. (USA)* 87:4697-4701.

10 37. **Chiarodo, A.** National Cancer Institute roundtable on prostate cancer; future research directions. *Cancer Res.*, 51:2498-2505. 1991.

15 38. **Abdel-Nabi, H., Wright, G.L., Gulfo, J.V., Petrylak, D.P., Neal, C.E., Texter, J.E., Begun, F.P., Tyson, I., Heal, A., Mitchell, E., Purnell, G., y Hanwood, S.J.** Monoclonal antibodies and radioimmunoconjugates in the diagnosis and treatment of prostate cancer, *Semin Urol.*, 10:45-54, 1992.

### Segunda Serie de Experimentos

#### 20 *Expresión del Antígeno de Membrana Específico de la Próstata*

Los solicitantes han clonado recientemente un ADN complementario de 2,65 kb que codifica PSM, el antígeno de membrana específico de la próstata reconocido por el anticuerpo monoclonal anti-próstata 7E11-C5.3. Los análisis inmunohistoquímicos de las líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP, DU-145 y PC-3 para detectar la expresión de PSM utilizando el anticuerpo 7E11-C5.3 muestran una tinción intensa en las células LNCaP, sin expresión detectable en las células DU-145 y PC-3. La transcripción/traducción acopladas *in vitro* del ADNc de longitud completa de 2,65 kb de PSM rinde una proteína de 84 kDa que corresponde al peso molecular predicho del polipéptido PSM. La modificación posterior a la traducción de esta proteína con microsomas pancreáticos caninos rinde el antígeno PSM de 100 kDa esperado. Después de transfectar las células PC-3 con el ADNc de longitud completa de PSM en un vector de expresión eucariota los solicitantes detectan la expresión de la glicoproteína PSM mediante análisis Western utilizando el anticuerpo monoclonal 7E11-C5.3. El análisis de protección de ribonucleasa demuestra que la expresión del ARNm de PSM es casi totalmente específico de la próstata en los tejidos humanos. La expresión de PSM parece ser mayor en estados privados de hormonas y está modulada hormonalmente por esteroides, con DHT reduciendo 8 veces la expresión de PSM en la línea celular de cáncer de próstata humano LNCaP, testosterona reduciendo PSM 3-4 veces, y los corticosteroides sin mostrar un efecto significativo. Los tejidos prostáticos normales y malignos muestran de manera consistente una expresión alta de PSM, mientras que hemos encontrado una expresión de PSM heterogénea y a veces ausente en la hiperplasia prostática benigna. Los tumores de LNCaP implantados y crecidos tanto ortotópicamente como subcutáneamente en ratones desnudos, expresan PSM de manera abundante proporcionando un sistema de modelo *in vitro* excelente para estudiar la regulación y la modulación de la expresión de PSM.

### Detalles Experimentales

#### 45 *Materiales y Métodos*

##### *Células y Reactivos*

Las líneas celulares LNCaP, DU-145 y PC-3 se obtuvieron de la American Type Culture Collection. Los detalles respecto al establecimiento y las características de estas líneas celulares se han publicado anteriormente (5A, 7A, 8A). A no ser que se especifique otra cosa, las células LNCaP se crecieron en medio RPMI 1640 suplementado con L-glutamina, aminoácidos no esenciales y 5% de suero fetal de ternera (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD.) en un incubador con CO<sub>2</sub> a 37°C. Las células DU-145 y PC-3 se crecieron en medio esencial mínimo suplementado con 10% de suero fetal de ternera. Todos los medios celulares se obtuvieron de la MSKCC Media Preparation Facility. Las enzimas de restricción y de modificación se obtuvieron de Gibco-BRL a no ser que se especifique otra cosa.

##### 55 *Detección Inmunohistoquímica de PSM*

Se utilizó el método de detección avidina-biotina para analizar las líneas celulares de cáncer de próstata para detectar la expresión del antígeno PSM (9A). Se realizaron citocentrifugados celulares en portaobjetos de vidrio utilizando 60 5 x 10<sup>4</sup> células/100  $\mu$ l por portaobjeto. Los portaobjetos se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con el suero supresor apropiado durante 20 minutos. El suero supresor se eliminó y las células se incubaron con anticuerpo monoclonal 7E11-C5.3 diluido (5 g/ml) durante 1 hora. Las muestras se lavaron con PBS y se incubaron secuencialmente con anticuerpos secundarios durante 30 minutos y con los complejos avidina-biotina durante 30 minutos. La diaminobencidina sirvió como cromógeno y se produjo la aparición de color después de la contratinción con hematoxilina y montaje. En cada experimento se utilizaron como controles citocentrifugados celulares en duplicado. Como control 65 positivo, se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-citoqueratina CAM 5.2 seguido del mismo proceso que el descrito anteriormente. Las células EJ de carcinoma de vejiga humano sirvieron como control negativo.

## ES 2 276 390 T3

### *Transcripción/Traducción In Vitro del Antígeno PSM*

El plásmido 55A que contiene el ADNc de longitud completa de PSM de 2,65 kb en el plásmido pSPORT 1 (Gibco-BRL) se transcribió *in vitro* utilizando el sistema Promega TNT (Promega Corp. Madison, WI.). Se añadió ARN polimerasa T7 al ADNc en una mezcla de reacción que contiene lisado de reticulocitos de conejo, una mezcla de aminoácidos sin metionina, tampón, y <sup>35</sup>S-metionina (Amersham) y se incubó a 30°C durante 90 minutos. La modificación posterior a la traducción de la proteína resultante se consiguió mediante la adición de microsomas pancreáticos caninos a la mezcla de reacción (Promega Corp. Madison, WI.). Los productos proteicos se analizaron mediante electroforesis en geles SDS-PAGE al 10% que se trataron posteriormente con amplificador de autorradiografía Amplify (Amersham, Arlington Heights, IL.) según las instrucciones del fabricante y se secaron en un secador de vacío a 80°C. Los geles se autorradiografiaron toda la noche a -70°C utilizando Hyperfilm MP (Amersham).

### *Transfección de PSM en Células PC-3*

El ADNc de longitud completa de PSM se subclonó en el vector de expresión eucariota pREP7 (Invitrogen, San Diego, CA.). El ADN plasmídico se purificó a partir de bacterias transformadas DH5-alfa (Gibco-BRL) utilizando columnas de aislamiento de plásmidos Qiagen maxi-prep (Qiagen Inc., Chatsworth, CA.). El ADN plasmídico purificado (6-10 g) se diluyó con 900 µl de medio Optimem (Gibco-BRL) y se mezcló con 30 µl de reactivo Lipofectina (Gibco-BRL) que se había diluido previamente con 900 µl de medio Optimem. Esta mezcla se añadió a frascos de cultivo T-75 de células PC-3 confluentes en un 40-50% en medio Optimem. Después de 24-36 horas, se tripsinizaron las células y se dividieron en placas de 100 mm que contenían medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal de ternera y 1 mg/ml de Higromicina B (Calbiochem, La Jolla, CA.). La dosis de Higromicina B utilizada se determinó previamente mediante un ensayo citotóxico de respuesta tiempo/dosis. Las células se mantuvieron en este medio durante 2-3 semanas cambiando el medio y la Higromicina B cada 4-5 días hasta que aparecieron colonias discretas. Las colonias se aislaron utilizando cilindros de clonación de 6 mm y se expandieron en el mismo medio. Como control, también se transfectaron células PC-3 con el plásmido pREP7 solo. Se aisló el ARN de las células transfectadas y se detectó la expresión del ARNm de PSM mediante análisis de Protección de ARNasa (descrito más adelante) y mediante análisis Northern.

### *Detección por Transferencia Western de la Expresión de PSM*

Se aislaron lisados de proteínas crudos a partir de células LNCaP, PC-3 y PC-3 transfectadas con PSM como se ha descrito previamente (10A). También se aislaron membranas celulares de LNCaP según métodos publicados (10A). Las concentraciones de proteínas se cuantificaron mediante el método Bradford utilizando el kit de reactivos de proteínas BioRad (BioRad, Richmond, CA.). Después de la desnaturalización, se sometieron a electroforesis 20 g de proteína en un gel SDS-PAGE al 10% a 25 mA durante 4 horas. Los geles se electrotransfirieron a membranas Immobilon P (Millipore, Bedford, MA.) toda la noche a 4°C. Las membranas se bloquearon en 0,15 M NaCl/0,01 M Tris-HCl (TS) más 5% BSA seguido de 1 hora de incubación con el anticuerpo monoclonal 7E11-C5.3 (10 g/ml). Las transferencias se lavaron 4 veces con 0,15 M NaCl/0,01 M Tris-HCl/0,05% Triton X-100 (TS-X) y se incubaron durante 1 hora con IgG anti-ratón de conejo (Accurate Scientific, Westbury, N.Y.) a una concentración de 10 g/ml.

Las transferencias se lavaron 4 veces con TS-X y se marcaron con <sup>125</sup>I-Proteína A (Amersham, Arlington Heights, IL.) a una concentración de 1 millón de cpm/ml. Las transferencias se lavaron 4 veces con TS-X y se secaron en papel Whatman 3MM, seguido de autorradiografía toda la noche a -70°C utilizando Hyperfilm MP (Amersham).

### *Crecimiento Ortotópico y Subcutáneo de Tumor de LNCaP en Ratones Desnudos*

Las células LNCaP se recogieron de cultivos subconfluentes mediante una exposición de 1 minuto a una disolución de 0,25% tripsina y 0,02% EDTA. Las células se resuspendieron en medio RPMI 1640 con 5% de suero fetal bovino, se lavaron y se diluyeron bien en Matrigel (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA.) o en disolución salina equilibrada de Hank sin calcio ni magnesio (HBSS). Para la inyección *in vivo* sólo se utilizaron suspensiones celulares con una viabilidad mayor del 90% determinada por exclusión de azul de tripán. Los ratones atómicos Swiss macho (nu/nu) de 4-6 semanas de edad se obtuvieron de la Memorial Sloan-Kettering Cancer Center Animal Facility. Para la inyección subcutánea de las células tumorales, se inyectaron 1 millón de células LNCaP resuspendidas en 0,2 ml de Matrigel en las extremidades posteriores de cada ratón utilizando una jeringa desechable con una aguja de 28 G. Para la inyección ortotópica, primero se anestesió a los ratones con una inyección intraperitoneal de Pentobarbital y se pusieron en decúbito supino. El abdomen se limpió con Betadine y la próstata se expuso a través de una incisión vertical siguiendo la línea alba. Se inyectaron 2,5 millones de células tumorales LNCaP en 0,1 ml directamente en cada lóbulo posterior utilizando una jeringa de 1 ml desechable y una aguja de 28 G. Se inyectaron células LNCaP con y sin Matrigel. El cierre abdominal se realizó en una capa utilizando grapas para heridas Autoclip (Clay Adams, Parsippany, N.J.). Los tumores se recogieron en 6-8 semanas, se confirmaron histológicamente por la facultad del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center Pathology Department y se congelaron en nitrógeno líquido para el aislamiento posterior del ARN.

### *Aislamiento de ARN*

El ARN celular total se aisló a partir de células y tejidos mediante técnicas estándar (11,12) así como utilizando RNazol B (Cinna/Biotech, Houston, TX.). Las concentraciones y la calidad del ARN se evaluaron mediante espec-

## ES 2 276 390 T3

troscopía UV en un espectrofotómetro Beckman DU 640 y mediante análisis en gel. Las muestras de ARN total de tejido humano se obtuvieron de Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA.

### *Ensayos de Protección de Ribonucleasa*

5 Una parte del ADNc de PSM se subclonó en el vector plasmídico pSPORT 1 (Gibco-BRL) y se verificó la orientación del inserto de ADNc respecto a los promotores de T7 y de ARN polimerasa SP6 adyacentes mediante análisis de restricción. La linearización de este plásmido en posición 5' respecto al inserto de PSM seguido de transcripción con ARN polimerasa SP6 rinde una sonda de ARN antisentido de 400 nucleótidos, de los que 350 nucleótidos deben protegerse frente a la digestión por ARNasa con ARN de PSM. Esta sonda se utilizó en la figura 20. El plásmido 10 IN-20 que contiene un ADNc parcial de 1 kb de PSM en el plásmido pCR II (Invitrogen) también se utilizó para la síntesis de ribosonda. El IN-20 linearizado con Xmn I (Gibco-BRL) rinde una sonda de ARN anti-sentido de 298 nucleótidos cuando se transcribe utilizando ARN polimerasa SP6, de la que 260 nucleótidos deben protegerse frente a la digestión por ARNasa con ARNm de PSM. Esta sonda se utilizó en las figuras 21 y 22. Las sondas se sintetizaron 15 utilizando ARN polimerasa SP6 (Gibco-BRL), NTPr (Gibco-BRL), RNAsina (Promega) y <sup>32</sup>P-CTPr (NEN, Wilmington, DE.) según protocolos publicados (13). Las sondas se purificaron en columnas de purificación NENSORB 20 (NEN) y aproximadamente 1 millón de cpm de sonda de PSM purificada marcada radiactivamente se mezclaron con 10 g de cada ARN y se hibridaron toda la noche a 45°C utilizando tampones y reactivos del kit RPA II (Ambion, Austin, TX). Las muestras se procesaron según las instrucciones del fabricante y se analizaron en geles desnaturalizantes 5% poli(acrilamida)/7M urea utilizando reactivos Seq ACRYL (ISS, Natick, MA.). Los geles se precalentaron a 20 55°C y se corrieron durante aproximadamente 1-2 horas a 25 vatios. Los geles se fijaron durante 30 minutos en 10% metanol/10% ácido acético, se secaron en papel Whatman 3MM a 80°C en un secador de vacío BioRad y se autorradiografiaron toda la noche con Hyperfilm MP (Amersham). La cuantificación de la expresión de PSM se determinó utilizando un densitómetro mediante barrido de láser (LKB, Piscataway, N.J.).

### *Experimento de Modulación por Esteroides*

Se plaquearon células LNCaP (2 millones) en frascos de cultivo T-75 en medio RPMI 1640 suplementado con 5% de suero fetal de ternera y se crecieron 24 horas hasta aproximadamente un 30-40% de confluencia. Los frascos de 30 cultivo se lavaron varias veces con disolución salina tamponada con fosfato y se añadió medio RPMI suplementado con 5% de suero extraído con carbón. Las células se crecieron durante otras 24 horas, después de las cuales se añadieron dihidrotestosterona, testosterona, estradiol, progesterona y dexametasona (Steraloids Inc., Wilton, NH.) a una concentración final de 2 nM. Las células se crecieron durante 24 horas más y el ARN se recogió como se ha descrito previamente y se analizó la expresión de PSM mediante análisis de protección de ribonucleasa.

### *Resultados Experimentales*

#### *Detección Inmunohistoquímica de PSM*

40 Utilizando el anticuerpo monoclonal anti-PSM 7E11-C5.3, la expresión de PSM se detecta claramente en la línea celular de cáncer de próstata LNCaP, pero no se detecta en las líneas celulares PC-3 y DU-145 (figura 17) de acuerdo con resultados publicados previamente (4A). Todos los tejidos prostáticos normales y malignos analizados se tiñeron positivamente para la expresión de PSM (datos no publicados).

#### *Transcripción/Traducción In Vitro del Antígeno PSM*

45 Como se muestra en la figura 18, la transcripción/traducción acopladas *in vitro* del ADNc de longitud completa de 2,65 kb de PSM rinde una especie proteica de 84 kDa de acuerdo con el producto proteico esperado a partir del marco de lectura abierto de 750 aminoácidos de PSM. Después de modificación posterior a la traducción utilizando 50 microsomas pancreáticos caninos se obtuvo una especie proteica glicosilada de 100 kDa consistente con el antígeno PSM nativo maduro.

#### *Detección del Antígeno PSM en Membranas Celulares de LNCaP y en Células PC-3 Transfectadas*

55 Las células PC-3 transfectadas con el ADNc de longitud completa de PSM en el vector de expresión pREP7 se ensayaron para detectar la expresión del ARNm de PSM mediante análisis Northern (datos no mostrados). Un clon con una expresión alta del ARNm de PSM se seleccionó para analizar el antígeno PSM mediante transferencia Western utilizando el anticuerpo 7E11-C5.3. En la figura 19, el antígeno PSM de 100 kDa se expresa en lisado celular y en fracciones de membrana de LNCaP, así como en las células PC-3 transfectadas con PSM pero no en las células PC-3 60 nativas. Esta expresión detectable en las células PC-3 transfectadas prueba que el ADNc de 2,65 kb de PSM clonado previamente codifica el antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal anti-próstata 7E11-C5.3 y que el antígeno se ha glicosilado apropiadamente en las células PC-3, ya que el anticuerpo reconoce un epítipo en PSM que contiene carbohidratos.

#### *Expresión del ARNm de PSM*

65 La expresión del ARNm de PSM en tejidos humanos normales se analizó utilizando ensayos de protección de ribonucleasa. La expresión tisular de PSM aparece predominantemente en la próstata, con unos niveles de expresión

detectables muy bajos en cerebro y glándula salival humanos (figura 20). No fue evidente una expresión detectable del ARNm de PSM en tejidos humanos no prostáticos cuando se analizó mediante análisis Northern (datos no mostrados). También hemos apreciado a veces una expresión de PSM detectable en tejido del intestino delgado humano normal aunque esta expresión del ARNm es variable dependiendo de la ribosonda específica utilizada (datos no mostrados).

5 Todas las muestras de próstata humana normal y de adenocarcinoma prostático humano ensayadas mostraron expresión de PSM claramente detectable, mientras que hemos observado una expresión de PSM generalmente disminuida o ausente en tejidos con hiperplasia benigna (figura 21). En tumores de LNCaP humanos crecidos tanto ortotópicamente como subcutáneamente en ratones desnudos hemos detectado una expresión de PSM abundante con o sin la utilización de matrigel, que se requiere para el crecimiento de las células LNCaP implantadas subcutáneamente (figura 21). La

10 expresión del ARNm de PSM está claramente modulada por la presencia de esteroides a dosis fisiológicas (figura 22). DHT disminuye la expresión 8-10 veces después de 24 horas y la testosterona disminuye la expresión de PSM 3-4 veces. El estradiol y la progesterona también disminuyen la expresión de PSM en las células LNCaP, quizá como resultado de la unión al receptor de andrógenos mutado que se sabe que existe en la célula LNCaP. En resumen, la expresión de PSM es mayor en las células LNCaP no tratadas crecidas en medio sin esteroides, una situación que

15 proponemos que estimula el estado sin hormonas (castrado) *in vivo*. Este experimento se repitió a dosis de esteroides que variaban de 2-200 nM y a tiempos de 6 horas a 7 días con resultados similares; la máxima disminución del ARNm de PSM se observó con DHT a las 24 horas a dosis de 2-20 nM.

### 20 *Discusión Experimental*

Con el fin de entender mejor la biología de la próstata humana tanto en estados normales como neoplásicos, necesitamos aumentar nuestro conocimiento estudiando las diferentes proteínas y otras características que son únicas de esta importante glándula. Las investigaciones previas han proporcionado dos biomarcadores prostáticos valiosos, PAP y PSA, que han tenido un impacto significativo en el diagnóstico, tratamiento, y en el manejo de las malignidades

25 de la próstata. Nuestro presente trabajo que describe la caracterización preliminar del antígeno de membrana específico de la próstata (PSM) muestra que éste es un gen con muchas características interesantes. PSM es casi completamente específico de la próstata como lo son PAP y PSA, y como tal puede permitir una descripción adicional de las funciones y comportamiento únicos de la próstata. La secuencia predicha de la proteína PSM (3) y su presencia en la membrana de las células LNCaP tal y como se ha determinado mediante transferencia Western e inmunohistoquímica, indican

30 que es una proteína integral de membrana. Por lo tanto, PSM proporciona un epítipo de la superficie celular atractivo para la obtención de imágenes diagnósticas dirigida por anticuerpo y las modalidades de acción citotóxicas (14). La capacidad de sintetizar el antígeno PSM *in vitro* y de producir xenoinjertos de tumores que mantienen niveles altos de expresión de PSM nos proporciona un sistema de modelo conveniente y atractivo para estudiar y caracterizar adicionalmente la regulación y la modulación de la expresión de PSM. También, el alto nivel de expresión de PSM en

35 las células LNCaP proporciona un sistema de modelo *in vitro* excelente. Debido a que la expresión de PSM responde a hormonas esteroides y a que puede estar altamente expresado en enfermedades refractarias a hormonas (15) es imprescindible elucidar el papel potencial de PSM en la evolución del cáncer de próstata independiente de andrógenos. La detección de la expresión del ARNm de PSM en cantidades muy pequeñas en el cerebro, glándula salival e intestino delgado justifica investigaciones adicionales, aunque estos tejidos fueron negativos respecto a la expresión del antígeno

40 PSM mediante inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo 7E11-C5.3 (16). En todos estos tejidos, especialmente en el intestino delgado, detectamos expresión del ARNm utilizando una sonda correspondiente a una región del ADN de PSM cercana al extremo 3', mientras que fuimos incapaces de detectar expresión cuando utilizamos una sonda de PSM del extremo 5'. Estos resultados pueden indicar que el transcrito ARNm de PSM es sometido a corte y empalme alternativo en diferentes tejidos. Estudios proteicos previos han sugerido que el anticuerpo 7E11-C5.3 puede

45 detectar otras dos especies proteicas un poco más grandes además del antígeno PSM de 100 kDa (17). Estas otras especies proteicas pueden observarse en el lisado y muestras de membrana de LNCaP en la figura 19. Los orígenes posibles de estas proteínas incluyen ARNm de PSM sometido a corte y empalme alternativo, otros genes distintos pero muy relacionados con PSM, o diferentes modificaciones posteriores a la traducción de la proteína PSM. Actualmente estamos investigando estas posibilidades.

50 El método de los solicitantes se basa en quimeras promotor específico del tejido prostático:enzima o citoquina. Examinaremos la activación específica de promotor de profármacos tales como ganciclovir no tóxico que se convierte en un metabolito tóxico por la timidina quinasa del herpes simple o el profármaco ácido 4-(bis(2-cloroetil)amino) benzoil-1-glutámico al agente alquilante ácido benzoico de mostaza por la carboxi peptidasa de pseudomonas G2.

55 Como estos compuestos se activan por la enzima (quimera) específicamente en el tumor el fármaco activo se libera sólo localmente en el entorno del tumor, destruyendo las células tumorales circundantes. También examinaremos la activación específica de promotor de citoquinas tales como IL-12, IL-2 o GM-CSF para activación y vacunación antitumoral específica. Por último, también puede ser útil en este área la activación específica tisular de promotor de los genes de la muerte celular.

### 60 *Quimeras para Terapia Génica*

El establecimiento de "ADN quimérico" para terapia génica requiere la unión de diferentes segmentos de ADN entre sí para obtener un ADN nuevo que tiene las características de las dos especies de ADN precursor implicadas en

65 la unión. Para este propósito las dos piezas que se unen implican diferentes aspectos funcionales del ADN, la región promotora que permite la lectura del ADN para la formación del ARNm proporcionará especificidad y la secuencia de ADN que codifica ARNm proporcionará ADN funcional terapéutico.

*ADN - Enzima Indicada o ARNm de Citoquinas*

Cuando son eficaces, los fármacos antitumorales pueden producir la regresión de grandes cantidades de tumor. Los requerimientos principales para la actividad antitumoral de los fármacos es el requerimiento para conseguir tanto un tiempo lo suficientemente largo (t) como una concentración lo suficientemente alta (c) (cxt) de exposición del tumor al fármaco tóxico como para asegurar un daño celular suficiente para que se produzca la muerte celular. El fármaco también debe ser "activo" y la toxicidad para el tumor mayor que para las células normales del anfitrión (22). La disponibilidad del fármaco para el tumor depende del flujo sanguíneo del tumor y de la capacidad de difusión de los fármacos. El flujo sanguíneo al tumor no proporciona selectividad ya que el flujo sanguíneo hacia muchos de los tejidos normales es frecuentemente tan alto o mayor que hacia el tumor. La mayoría de los fármacos citotóxicos quimioterapéuticos son frecuentemente tan tóxicos para el tejido normal como para el tejido tumoral. Las células en división son frecuentemente más sensibles que las células normales que no están en división, pero en muchos tumores sólidos de crecimiento lento tal como el cáncer de próstata este hecho no proporciona una especificidad antitumoral (22).

Previamente, un medio para incrementar la especificidad tumoral de los fármacos antitumorales fue utilizar enzimas asociadas a los tumores para activar profármacos no tóxicos en agentes citotóxicos (19). Un problema de este método fue que la mayoría de las enzimas encontradas en los tumores no eran totalmente específicas en su actividad y se encontraron en otros tejidos enzimas activas con un sustrato similar o la misma enzima sólo en cantidades un poco menores y por lo tanto los tejidos normales todavía presentaban riesgo de ser dañados.

Para proporcionar una especificidad absoluta y una actividad única, se encontraron enzimas virales, bacterianas y fúngicas que tenían una especificidad única para profármacos seleccionados que no estaban presentes en células humanas o de otros animales. Los intentos de utilizar enzimas tales como la timidina quinasa del herpes simple, la citosina desaminasa y la carboxipeptidasa G-2 bacterianas se unieron a sistemas de selección con anticuerpos con un éxito moderado (19). Desafortunadamente, las enzimas dirigidas por anticuerpos limitan el número de enzimas disponibles por célula. Además, la mayoría de los anticuerpos no tienen una relación alta entre la acción frente a tejidos tumorales respecto a normales por lo que los tejidos normales todavía están expuestos reduciendo la especificidad de estas enzimas únicas. Los anticuerpos son moléculas grandes que tienen unas propiedades de difusión bajas y la adición del peso molecular de las enzimas reduce más la difusión de los anticuerpos.

La terapia génica podría producir el mejor resultado deseado si pudiera conseguir la expresión específica de una proteína en el tumor y no en el tejido normal con el fin de que esté disponible una concentración local de la enzima alta para la producción del fármaco activo en el entorno del tumor (21).

*Citoquinas*

El grupo de investigación de los solicitantes ha demostrado que los Solicitantes pueden "curar" a un animal específicamente y de manera no tóxica de un tumor establecido, en modelos de cáncer de vejiga y de próstata. El cáncer de próstata fue el más difícil de curar especialmente si se había crecido ortotópicamente en la próstata.

Nuestro trabajo ha demostrado que tumores tales como el de vejiga y de próstata no eran inmunogénicos, es decir, que la administración de células tumorales irradiadas al animal antes de la administración posterior de células tumorales no irradiadas no resultó en una reducción del número de células tumorales para producir un tumor ni redujo la velocidad de crecimiento del tumor. Pero si el tumor se transfectaba con un retrovirus y secretaba grandes concentraciones de citoquinas tales como IL-2 esto podría actuar como una vacuna antitumoral y también podría reducir el potencial de crecimiento de un tumor ya establecido y en crecimiento. IL-2 fue la mejor, GM-CSF también presentó actividad mientras otras citoquinas fueron mucho menos activas. En estudios clínicos utilizando sólo IL-2 para la inmunestimulación, se tuvieron que administrar concentraciones muy altas que fueron tóxicas. La clave para el éxito de la célula tumoral modificada genéticamente con citoquinas es que la citoquina se produzca en el sitio del tumor localmente y que no sea tóxica y que estimule el reconocimiento inmune del tumor y que permita el reconocimiento específico y no tóxico y la destrucción del tumor. Los mecanismos exactos de cómo la producción de IL-2 por la célula tumoral activa el reconocimiento inmune no se entienden totalmente, pero una explicación es que evita la necesidad de que las células T colaboradoras produzcan citoquinas y estimula directamente las células CD8 citotóxicas tumorales activadas por antígeno.

*Activación de Quimera de ADN Específica de Promotor y de Tejido**Sistema Tumorales No Prostáticos*

Se ha observado en tumores no prostáticos que la utilización de la activación específica de promotor puede dar lugar selectivamente a la expresión génica específica de tejido del gen transfectado. En melanomas la utilización del promotor de tirosinasa que codifica la enzima responsable de la expresión de la melanina produjo un aumento de más de 50 veces de la expresión del gen informador dirigida por promotor en células de melanoma y no en células que no eran de melanoma. Una activación específica similar se vio en las células de melanoma transfectadas cuando crecían en ratones. En este experimento las células que no eran de melanoma o los melanocitos no expresaban el producto del gen informador dirigido por tirosinasa. El grupo de investigación de los Laboratorios Welcome ha clonado y secuenciado la región promotora del gen que codifica el antígeno carcinoembrionario (CEA). CEA se expresa en las células del colon y del carcinoma de colon aunque específicamente en citosina desaminasa metastásica que convierte

5 fluorocitosina en 5 fluorouracil y se observa un gran incremento de la capacidad de matar selectivamente células tumorales de colon dirigidas por el promotor de CEA pero no células hepáticas normales en división o sin dividirse. *In vivo* observaron que las células tumorales del entorno que no se habían transfectado con el gen de la citosina desaminasa también fueron eliminadas, y que no había toxicidad para el animal anfitrión cuando los grandes tumores disminuían después del tratamiento. La timidina quinasa del virus del herpes simple (HSV) activa de manera similar el profármaco ganciclovir en tóxico frente a células cancerosas en división y se ha visto que la timidina quinasa de HSV se activa específicamente por promotores específicos de tejido.

#### *Sistemas Tumorales Prostáticos*

10 La clave terapéutica para una terapia eficaz contra el cáncer es conseguir especificidad y evitar la toxicidad para el paciente. La terapia génica puede proporcionar una parte clave para la especificidad en cuanto a que los tejidos no esenciales tales como la próstata y los tumores prostáticos producen proteínas específicas de tejido, tales como fosfatasa ácida (PAP), antígeno específico de la próstata (PSA) y un gen que hemos clonado, el antígeno de membrana específico de la próstata (PSM). Los tejidos como la próstata contienen factores de transcripción específicos de tejido seleccionados que son los que se unen a la región promotora del ADN del ARNm específico de estos tejidos. El promotor de PSA se ha clonado y estamos investigando su utilización como un promotor específico de la próstata para las células tumorales de la próstata. Habitualmente, los pacientes que están siendo tratados de cáncer prostático metastásico han sido sometidos a terapia de privación de andrógenos que reduce drásticamente la expresión del ARNm de PSA. Por otra parte, PSM incrementa su expresión con privación de hormonas lo que significa que se expresará aún más intensamente en pacientes que están siendo tratados con terapia hormonal. Los trabajos preliminares en colaboración con el laboratorio del Dr. John Isaacs demuestran que PSM se expresa cuando la región cromosómica humana que contiene el gen PSM humano se transfiere al tumor de rata AT-6. AT-6 es un tumor metastásico independiente de andrógenos. El mismo cromosoma transferido a tejidos o tumores no prostáticos no se expresa y, por lo tanto, estas células podrían utilizarse como un modelo animal para estos experimentos. Las células LNCaP humanas positivas para PSA, PSM se utilizarán para ensayar en ratones desnudos.

#### **Referencias de la Segunda Serie de Experimentos**

- 30 1. Coffey, D.S, Prostate Cancer-An overview of an increasing dilemma. *Cancer Supplement*, 71,3: 880-886, 1993.
2. Chiarodo, A. National Cancer Institute roundtable on prostate cancer future research directions. *Cancer Res.*, 51: 2498-2505, 1991.
- 35 3. Israeli, R.S., Powell, G.T., Fair, W.R., and Heston, W.D.W. Molecular cloning of a complementary DNA encoding a prostate-specific membrana antigen. *Cancer Res.*, 53: 227-230, 1993.
4. Horoszewicz, J.S., Kawinski, E., y Murphy, G.P. Monoclonal antibodies to a new antigenic marker in epithelial cells and serum of prostatic cancer patients. *Anticancer Res.*, 7: 927-936, 1987.
- 40 5. Horoszewicz, J.S., Leong, S.S., Kawinski, E., Karr, J.P., Rosenthal, H., Chu, T.M., Mirand, E.A., y Murphy, G.P. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.*, 43 1809-1818, 1983.
6. Abdel-Nabi, H., Wright, G.L., Gulfo, J.V., Petrylak, D.P., Neal, C.E., Texter, J.E., Begun, F.P., Tyson, I., Heal, A., Mitchell, E., Purnell, G., y Harwood, Monoclonal antibodies and radioimmunoconjugates in the diagnosis and treatment of prostate cancer. *Semin, Urol.*, 10: 45-54, 1992.
- 45 7. Stone, K, R., Mickey, D.D. Wunderli, H., Mickey, G.H., y Paulson, D.F. Isolation of a hueman prostate carcinoma cell line (Du-145). *Int J. Cancer*, 21:274-281. 1978.
- 50 8. Kaign, M.E., Narayan, K.S., Ohnuki, Y., y Lechner, J.F. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest. Urol.*, 17:16-23, 1979.
9. Hsu, S.M, Raine, L, y Fanger, H. Review of present methods of immunohistochemical detection. *Am. J. Clin. Path.* 75: 734-738, 1961.
- 55 10. Harlow, E., y Lane, D. Antibodies: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, p. 449, 1988.
- 60 11. Glisin, V., Crkvenjakov., R., y Byus. C. Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry*, 13: 2633-2637, 1974.
12. Aviv, H., y Leder, P. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69:1408-1412, 1972.
- 65 13. Melton, D.A, Krieg, P.A, Rebagliati, M.R., Maniatis, T.A., Zinn, K., y Careen, M.R. Efficient *in-vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucl. Acids. Res.* 12: 7035-7056, 1984.

14. **Comunicación Personal de Cytogen Corporation, Princeton, N.J.**

15 15. **Axelrod, N.R., Gilman, S.C. D'Aleo, C.J., Petrylak, D, Reuter, V., Gulfo, J.V., Saad, A., Cordon-Cardo, C., y Scher, H.J.** Preclinical results and human immunohistochemical studies with <sup>90</sup>Y-CYT-356 a new prostatic cancer therapeutic agent. AUA Proceedings, *Abstract* 596, 1992.

10 16. **Lopes, A.D., Davis, W.L., Rosenstraus, M.J., Uveges, A.J., y Gilman, S.C.** Immunohistochemical and pharmacokinetic characterization of the site-specific immunoconjugate CYT-356 derived from antiprostata monoclonal antibody 7E11-C5. *Cancer Res.*, 50: 6423-6429, 1990.

10 17. **Troyer, J.K., Qi, F., Beckett, M.L., Morningstar, M.M. y Wright, G.L** Molecular characterization of the 7E11-C5 prostate tumor-associated antigen. AUA Proceedings. *Abstract* 482, 1993.

15 18. **Roemer, K., Friedmann, T.** Concepts and strategies for human gene therapy. *FEBS*. 223:212-225.

15 19. **Antonie, P. Springer, C.J., Bagshawe, F., Searie, F., Melton, R.G., Rogers, G.T., Burke, P.J., Sherwood, R.F.** Disposition of the prodrug 4-bis(2chloroethyl)amino)benzoyl-1-glutamic acid and its active parent drug in mice. *Br. J. Cancer* 62:909-914, 1990.

20 20. **Connor, J. Bannerji, R. Saito, S., Heston, W.D.W., Fair, W.R, Gilboa, E.** Regression of bladder tumors in mice treated with interleukin 2 gene-modified tumor cells. *J. Exp. Med.* 177:1127-1134, 1993. (apéndice)

25 21. **Vile R., Hart, I.R.** *In vitro* and *in vivo* targeting of gene expression to melanoma cells. *Cancer Res.* 53:952-967. 1993.

25 22. **Warner, J.A, Heston, W.D.W.** Future developments of nonhormonal systemic therapy for prostatic carcinoma, *Urologic Clinics of North America* 18:25-33, 1991.

30 23. **Vile, R.G., Hart, I.R.** Use of tissue specific expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene to inhibit growth of established murine melanomas following direct intratumoral injection of DNA. *Cancer Res.* 53: 3860-3864, 1993.

*Tercera Serie de Experimentos*

35 *Detección Sensible de Micrometástasis Hematógenas Prostáticas Utilizando Cebadores Obtenidos de PSA y PSM en la Reacción en Cadena de la Polimerasa*

40 Hemos desarrollado un ensayo basado en PCR que permite la detección sensible de micrometástasis hematógenas en pacientes con cáncer de próstata. Realizamos una "PCR anidada", amplificando secuencias de ARNm únicas del antígeno específico de la próstata y del antígeno de membrana específico de la próstata y hemos comparado sus resultados respectivos. Las micrometástasis se detectaron en 2/30 pacientes (6,7%) mediante PCR con cebadores obtenidos de PSA, mientras que los cebadores obtenidos de PSM detectaron células tumorales en 19/16 pacientes (63,3%). Los 8 controles negativos fueron todos negativos en PCR de PSA y de PSM. Los ensayos se repitieron para confirmar los resultados, y los productos de PCR se verificaron mediante secuenciación de ADN y análisis Southern.

45 Los pacientes que contenían células tumorales de próstata circulantes detectadas mediante PCR de PSM pero no con PCR de PSA incluyeron 4 pacientes tratados previamente con prostatectomía radical y con niveles séricos de PSA no detectables en el momento de este ensayo. Se investigará la trascendencia de estos descubrimientos respecto a la futura recurrencia y progresión de la enfermedad.

50 La mejora de la supervivencia global de los pacientes con cáncer de próstata dependerá de un diagnóstico temprano. La enfermedad localizada, sin evidencia de diseminación fuera de la próstata, se trata con éxito bien con prostatectomía radical o con radiación externa, con unos resultados excelentes a largo plazo (2,3). El principal problema es que aproximadamente dos tercios de los hombres diagnosticados con cáncer de próstata presentan evidencia de una diseminación avanzada fuera de la próstata en el momento del diagnóstico, para la que actualmente no hay cura (4). La utilización de marcadores séricos clínicos tales como el antígeno específico de la próstata (PSA) y la fosfatasa ácida prostática (PAP) ha permitido a los médicos detectar carcinomas prostáticos antes y proporciona parámetros útiles para el seguimiento de las respuestas a la terapia (5). Aún así, a pesar de la llegada de ensayos sensibles para detectar PSA sérico, escáner óseo con radionúclido, escáner CT y otras modalidades para la obtención de imágenes, todavía no somos capaces de detectar la presencia de células micrometastásicas antes de su establecimiento como metástasis sólidas.

60 Los trabajos previos se han realizado utilizando la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar secuencias de ARNm únicas de mama, leucemia y otras células malignas en la circulación y que permite la detección temprana de micrometástasis (6,7). Recientemente, se ha publicado un método basado en PCR que utiliza cebadores obtenidos de la secuencia del ADN de PSA (8). En este estudio 3/12 pacientes con cáncer de próstata avanzado, en el estadio D, tenían micrometástasis hematógenas detectables.

65 Recientemente, hemos identificado y clonado un ADNc de 2,65 kb que codifica el antígeno de membrana específico de la próstata (PSM) de 100 kDa reconocido por el anticuerpo monoclonal anti-próstata 7E11-C5.3 (9). PSM es una glicoproteína integral de membrana que está altamente expresada en tumores y metástasis de próstata y es casi

completamente específica de la próstata (10). Muchos tumores anaplásicos y metástasis de hueso tienen una expresión de PSA variable y a veces no detectable, mientras que estas lesiones expresan de manera consistente altos niveles de PSM. Las células tumorales de próstata que escapan de la glándula de la próstata y entran en la circulación tienen probablemente el potencial para formar metástasis y son probablemente las células más agresivas y posiblemente anaplásicas, una población de células que puede no expresar altos niveles de PSA pero que puede retener una alta expresión de PSM. Por lo tanto, elegimos utilizar cebadores de ADN obtenidos de las secuencias de PSA y PSM en un ensayo de PCR para detectar células micrometastásicas en la circulación periférica. A pesar del alto grado de amplificación y sensibilidad de la PCR de ARN convencional, utilizamos el método de PCR "anidada" en el que primero amplificamos una secuencia diana, y posteriormente utilizamos este producto de PCR como molde para otro ciclo de amplificación por PCR con un nuevo conjunto de cebadores contenidos en la secuencia del producto previo. Este método nos ha permitido incrementar nuestro nivel de detección de una célula tumoral prostática por 10.000 células a más de una célula por diez millones de células.

### Detalles Experimentales

*Materiales y Métodos*

#### *Células y Reactivos*

Las células LNCaP y MCF-7 se obtuvieron de la American Type Culture Collection (Rockville, MD.). Los detalles respecto al establecimiento y características de estas líneas celulares se han publicado anteriormente (11,12). Las células se crecieron en medio RPMI 1640 suplementado con L-glutamina, aminoácidos no esenciales, obtenidos de la MSKCC Media Preparation Facility, y 5% de suero fetal de ternera (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD.) en un incubador con CO<sub>2</sub> a 37°C. Todos los medios celulares se obtuvieron de la MSKCC Media Preparation Facility. Los reactivos químicos rutinarios fueron de la más alta calidad posible y se obtuvieron de Sigma Chemical Company, St. Louis, MO.

#### *Especímenes de Sangre de los Pacientes*

Todos los especímenes de sangre utilizados en este estudio fueron de pacientes seguidos en las consultas externas de urología de MSKCC. Se obtuvieron dos tubos con anti-coagulante (con tapón morado) por paciente en el momento de su extracción de sangre programada. La obtención del espécimen se realizó según la aprobación del MSKCC Institutional Review Board. Las muestras se llevaron rápidamente al laboratorio para su procesamiento inmediato. Las determinaciones de PSA y PAP séricos se realizaron mediante técnicas estándar por el MSKCC Clinical Chemistry Laboratory. Las determinaciones de PSA se realizaron utilizando el ensayo Tándem PSA (Hybritech, San Diego, CA.). Los ocho especímenes de sangre utilizados como controles negativos fueron de 2 varones con valores normales de PSA sérico y BPH verificada por biopsia, una mujer sana, 3 varones sanos, un paciente con cáncer de vejiga y un paciente con leucemia promielocítica aguda.

#### *Procesamiento/Extracción de ARN de las Muestras de Sangre*

Se mezclaron 4 ml de sangre venosa completa anticoagulada con 3 ml de disolución salina tamponada con fosfato enfriada en hielo y se puso cuidadosamente una capa superior de 8 ml de Ficoll (Pharmacia, Uppsala, Suecia) en un tubo de poliestireno de 15 ml. Los tubos se centrifugaron a 200 x g durante 30 minutos a 4°C. Utilizando una pipeta pasteur estéril, se eliminó cuidadosamente la capa leuco plaquetaria (aprox. 1 ml) y se volvió a diluir con 50 ml de disolución salina tamponada con fosfato enfriada en hielo en un tubo de polipropileno de 50 ml. Este tubo se centrifugó a 2.000 x g durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se decantó cuidadosamente y el sedimento se secó por goteo. Se añadió al sedimento un ml de RNazol B y se aisló el ARN total según las instrucciones del fabricante (Cinna/Biotech, Houston, TX.). Las concentraciones y pureza del ARN se determinaron mediante espectroscopía UV en un espectrofotómetro Beckman DU 640 y por análisis en gel.

#### *Determinación de la Sensibilidad de PCR*

El ARN se aisló a partir de células LNCaP y a partir de mezclas de células LNCaP y MCF-7 en proporciones determinadas (es decir, 1:100, 1:1.000, etc.) utilizando RNazol B. Se realizó PCR anidada como se ha descrito anteriormente con cebadores PSA y PSM con el fin de determinar el límite de detección del ensayo. El ADNc de LNCaP:MCF-7 (1:100.000) se diluyó con agua destilada para obtener concentraciones de 1:1.000.000 y 1:10.000.000. Las células MCF-7 se eligieron porque se han ensayado previamente y se ha visto mediante PCR que no expresan PSM.

#### *Reacción en Cadena de la Polimerasa*

Los cebadores externos de PSA utilizan partes de los exones 4 y 5 para rendir un producto de PCR de 486 pb y permiten la diferenciación entre la amplificación de ADNc y de ADN genómico que puede ser un posible contaminante. La secuencia del cebador en posición 5' que empieza en el nucleótido 494 de la secuencia de ADNc de PSA es 5'-TACCCACTGCATCAGGAACA-3' (SEQ ID No. 39) y el cebador en posición 3' en el nucleótido 960 es 5'-CCTTGAAGCACACCATTTACA-3' (SEQ ID No. 40). El cebador interno de PSA en posición 5' (que empieza en el nucleótido 559) 5'-ACACAGGCCAGGTATTTTCAG-3' (SEQ ID No. 41) y el cebador en posición 3' (en el nucleótido

894) 5'-GTCCAGCGTCCAGCACACAG-3' (SEQ ID No. 42) rinden un producto de PCR de 355 pb. Todos los cebadores se sintetizaron en la MSKCC Microchemistry Core Facility. 5 g del ARN total se transcribieron inversamente en ADNc en un volumen total de 201 utilizando transcriptasa inversa Superscript (Gibco-BRL) según las recomendaciones del fabricante. 11 de estos ADNc sirvieron como molde de partida para la reacción de PCR con cebadores externos. La mezcla de PCR 201 incluía: 0,5 U de polimerasa Taq (Promega Corp., Madison, WI.), tampón de reacción Promega, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 M de dNTP y 1,0 M de cada cebador. Esta mezcla se transfirió a un ciclador térmico de ADN Perkin Elmer 9600 y se incubó durante 25 ciclos. El perfil de PCR fue como sigue: 94°C x 15 seg., 60°C x 15 seg., y 72°C durante 45 seg. Después de 25 ciclos, las muestras se pusieron en hielo, y 11 de estas mezclas de reacción sirvieron como molde para otra ronda de PCR utilizando los cebadores internos. El primer conjunto de tubos se puso de nuevo en el ciclador térmico durante 25 ciclos adicionales. PCR-PSM requería la selección de pares de cebadores que también abarcaran un intrón con el fin de asegurar que se estaba amplificando ADNc y no ADN genómico. Debido a que no se ha determinado la secuencia del ADN genómico de PSM, esto implicó probar con diferentes pares de cebadores hasta que se encontró un par que producía el producto de PCR del tamaño esperado cuando se amplificaba el ADNc, pero que no producía ninguna banda a partir del molde de ADN genómico, lo que indicaba la presencia de un intrón grande. Los cebadores externos de PSM rindieron un producto de 946 pb y los cebadores internos un producto de 434 pb. El cebador externo de PSM en posición 5' utilizado fue 5'-ATGGGTGTTTGGTGGTATTGACC-3' (SEQ ID No. 43) (empezando en el nucleótido 1.401) y el cebador en 3' (en el nucleótido 2.348) fue 5'-TGCTTG GAGCATAGATGACATGC-3' (SEQ ID No. 44). El cebador interno de PSM en posición 5' (en el nucleótido 1.581) fue 5'-ACTCCTTCAAGAGCGTGGCG-3' (SEQ ID No. 45) y el cebador en posición 3' (en el nucleótido 2.015) fue 5'-AACACCATCCCTCGAACC-3' (SEQ ID No. 46). El ADNc utilizado fue el mismo que para el ensayo de PSA. La mezcla de PCR 501 incluía: 1 U de polimerasa Taq (Promega), 250 M de dNTP, 10 mM de β-mercaptoetanol, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, y 51 de una mezcla tampón 10x que contiene: 166 mM de NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 670 mM de Tris pH 8,8, y 2 mg/ml de BSA acetilada. La PCR se llevó a cabo en un ciclador térmico de ADN Perkin Elmer 480 con los parámetros siguientes: 94°C x 4 minutos durante 1 ciclo, 94°C x 30 seg., 58°C x 1 minuto y 72°C x 1 minuto durante 25 ciclos, seguido de 72°C x 10 minutos. Las muestras se pusieron en hielo y 21 de esta mezcla de reacción se utilizó como molde para otros 25 ciclos con una nueva mezcla de reacción que contiene los cebadores internos de PSM. La calidad del ADNc se verificó realizando reacciones control utilizando cebadores obtenidos de la β-actina que rinden un producto de PCR de 446 pb. El cebador en posición 5' utilizado fue 5'-AGGCCAACCGCGAGAAGATGA-3' (SEQ ID No. 47) (exón 3) y el cebador en posición 3' fue 5'-ATGTCACACTGGGGAAGC-3' (SEQ ID No. 48) (exón 4). La mezcla completa de PSA y 101 de cada mezcla de reacción de PSM se corrieron en geles de agarosa al 1,5-2%, se tiñeron con bromuro de etidio y se fotografiaron en un Eagle Eye Video Imaging System (Stratagene, Torrey Pines, CA.). Los ensayos se repitieron al menos 3 veces para verificar los resultados.

#### *Clonación y Secuenciación de los Productos de PCR*

Los productos de PCR se clonaron en el vector plasmídico pCR II utilizando el sistema de clonación TA (Invitrogen). Estos plásmidos se transformaron en células *E. coli* competentes utilizando métodos estándar (13) y se aisló el ADN plasmídico utilizando Magic Minipreps (Promega) y se cribó mediante análisis de restricción. Los clones TA se secuenciaron mediante el método didesoxi (14) utilizando Secuensa (U.S. Biochemical). Se desnaturalizaron 3-4 g de cada plásmido con NaOH y se precipitaron con etanol. Las reacciones de marcaje se llevaron a cabo según las recomendaciones del fabricante utilizando <sup>35</sup>S-dATP (NEN), y las reacciones se terminaron como se indica en el mismo protocolo. Los productos de la secuenciación se analizaron en geles 6% poliacrilamida/7 M urea a 120 vatios durante 2 horas. Los geles se fijaron durante 20 minutos en 10% metanol/10% ácido acético, se transfirieron a papel Whatman 3MM y se secaron en un secador de vacío durante 2 horas a 80°C. Los geles se autorradiografiaron a temperatura ambiente durante 18 horas.

#### *Análisis Southern*

Los geles de agarosa teñidos con etidio de los productos de PCR se sumergieron durante 15 minutos en 0,2 N HCl, seguido de 30 minutos en cada uno de 0,5 N NaOH/1,5 M NaCl y 0,1 M Tris pH 7,5/1,5 M NaCl. Los geles se equilibraron durante 10 minutos en 10 x SSC (1,5 M NaCl/0,15 M Citrato Sódico). El ADN se transfirió a membranas de nilón Nytran (Schleicher y Schuell) mediante transferencia por presión en 10 x SSC con un Posi-blotter (Stratagene). El ADN se entrecruzó con la membrana utilizando un Stratalinker UV (Stratagene). Las transferencias se pre-hibridaron a 65°C durante 2 horas y posteriormente se hibridaron con sondas de ADNc desnaturalizadas cebadas aleatoriamente marcadas con <sup>32</sup>P (PSM o PSA) (9,15). Las transferencias se lavaron dos veces en 1 x SSPE/0,5% SDS a 42°C y dos veces en 0,1 x SSPE/0,5% SDS a 50°C durante 20 minutos cada vez. Las membranas se secaron al aire y se autorradiografiaron de 30 minutos a 1 hora a -70°C con película Kodak X-Omat.

#### *Resultados Experimentales*

Nuestra técnica de amplificación por PCR con cebadores anidados mejoró nuestro nivel de detección de células prostáticas de aproximadamente una célula prostática por 10.000 células MCF-7 a más de una célula por millón de células MCF-7, utilizando tanto cebadores obtenidos de PSA como de PSM (figuras 26 y 27). Esto representa una mejora sustancial de nuestra capacidad para detectar enfermedad mínima. Las características de los 16 pacientes analizados respecto a su estadio clínico, tratamiento, valores séricos de PSA y PAP, y resultados de nuestro ensayo se muestran en la tabla 1. La PCR de PSA detectó células tumorales en 2/30 pacientes (6,7%) mientras que la PCR de PSM detectó células en 19/30 pacientes (63,3%). No hubo pacientes positivos para células tumorales por PSA que no fueran positivos por PSM mientras que PSM proporcionó 8 pacientes positivos no detectados por PSA. Los

pacientes 10 y 11 en la tabla 1, ambos con enfermedad refractaria a hormonas avanzada se detectaron tanto por PSA como por PSM. Los dos pacientes han muerto desde que se obtuvieron estas muestras. Los pacientes 4, 7 y 12, que fueron todos tratados con prostatectomías radicales al tener la enfermedad clínicamente localizada, y que no tenían valores séricos de PSA detectables 1-2 años después de la operación fueron positivos para células tumorales prostáticas circulantes mediante PSM-PCR, pero negativos en PSA-PCR. Una fotografía de un gel teñido con etidio de PSM-PCR representativa se muestra en la figura 28. Las muestras en el carril A representan productos de PCR generados a partir de los cebadores externos y las muestras en los carriles marcados como B son productos de pares de cebadores internos. La autorradiografía de la transferencia Southern de PSM correspondiente se muestra en la figura 29. La sensibilidad del análisis por transferencia Southern es superior a la de la tinción con etidio, como puede observarse en muchas muestras en las que el producto externo no es visible en la figura 28 pero es detectable mediante transferencia Southern como se muestra en la figura 29. Además, la muestra 3 en las figuras 28 y 29 (paciente 6 en la figura 30) parece contener tanto bandas externas como internas que son más pequeñas que las bandas correspondientes en los otros pacientes. La secuenciación de ADN ha confirmado que la secuencia de nucleótidos de estas bandas corresponde a la de PSM con la excepción de una pequeña delección. Esto puede representar bien un artefacto de la PCR, corte y empalme alternativo del ARNm de PSM en ese paciente o una mutación en PSM. Hemos observado descubrimientos similares con otras muestras en varias ocasiones (datos no publicados). Se ha confirmado que todas las muestras secuenciadas y analizadas por análisis Southern son positivos reales para PSA y PSM.

#### 20 *Detalles Experimentales*

La capacidad para clasificar en el estadio correcto a los pacientes con cáncer de próstata en el momento del diagnóstico es de vital importancia para seleccionar la terapia apropiada y para predecir la respuesta a largo plazo al tratamiento y la cura potencial. Actualmente, la clasificación antes de la cirugía consiste en un examen físico, determinaciones séricas de PSA y PAP, y varias modalidades de obtención de imágenes incluyendo ultrasonografía transrectal, escáner CT, escáner óseo con radionúclidos, e incluso escáner MRI. Sin embargo, ninguna modalidad actual afronta el problema de la enfermedad micrometastásica hematogena y el impacto negativo potencial que esto puede producir en el pronóstico. Los trabajos previos han mostrado que sólo un porcentaje pequeño de las células tumorales circulantes formarán de manera inevitable una metástasis sólida (16) y, sin embargo, la detección de y la cuantificación potencial de la carga de células tumorales circulantes puede ser muy valiosa para clasificar de manera más precisa la enfermedad. El impacto a largo plazo de la enfermedad micrometastásica hematogena debe estudiarse comparando el curso clínico de pacientes con estas células en su circulación con pacientes con un estadio y tratamiento similares pero negativos en el ensayo.

El nivel de detección significativamente más elevado de las células tumorales con PSM en comparación con PSA no nos resulta sorprendente ya que hemos observado una expresión de PSM más consistente en carcinomas de próstata en todos los estadios y grados comparada con una expresión de PSA variable en cánceres de próstata menos diferenciados y anaplásicos. Nos sorprendió detectar células tumorales en los tres pacientes que habían sido sometidos a prostatectomías radicales con cantidades posteriores no detectables de PSA sérico. Estos pacientes podrían considerarse "curados" por la cirugía según los criterios estándar, aunque aparentemente continúan teniendo células tumorales prostáticas. Sería interesante hacer un seguimiento del curso clínico de estos pacientes comparado con otros sin evidencia por PCR de enfermedad residual. Actualmente, estamos analizando muchas muestras de pacientes con el fin de verificar estos descubrimientos y quizá de identificar pacientes que presentan riesgo de enfermedad metastásica.

#### 45 **Referencias**

- 45 1. **Boring, C.C., Squires, T.S., y Tong, T.:** *Cancer Statistics, 1993*. *CA Cancer J. Clin.*, 437-26, 1993.
- 50 2. **Lepor, H., y Walsh, P.C.:** Long-term results of radical prostatectomy in clinically localized prostate cancer: Experience at the Johns Hopkins Hospital. *NCI Monogr.*, 7:117-122, 1988.
- 55 3. **Bagshaw, M.A., Cox, R.S., y Ray, G.R.:** Status of radiation treatment of prostate cancer at Stanford University. *NCI Monogr.*, 7:47-60, 1988.
- 60 4. **Thompson, I.M., Rounder, J.B., Teague, J.L. et al.:** Impact of routine screening for adenocarcinoma of the prostate on stage distribution. *J. Urol.*, 137:424-426, 1987.
- 65 5. **Chiarodo, A.:** A National Cancer Institute roundtable on prostate cancer; future research directions. *Cancer Res*, 51:2498-2505, 1991.
6. **Wu, A., Ben-Ezra, J. y Colombero, A.:** Detector of micrometastasis in breast cancer by the polymerase chain reaction. *Lab. Invest.*, 62:109A, 1990.
7. **Fey, M.F., Kulozik, A.E., y Hansen-Hagge, T.E.:** The polymerase chain reaction: A new tool for the detection of minimal residual disease in hematological malignancies. *Eur. J. Cancer*, 27:89-94, 1991.
8. **Moreno, J.G., Croce, C.M., Fischer, R., Monne, M., Vihko, P., Mulholland, S.G., y Gomella, L.G.:** Detection of hematogenous micrometastasis in patients with prostate cancer. *Cancer Res.*, 52:6110-6112, 1992.

## ES 2 276 390 T3

9. **Israeli, R.S., Powell, C.T., Fair, W.R., y Heston, W.D.W.:** Molecular cloning of a complementary DNA encoding a prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res.*, 53:227-230, 1993.

10. **Israeli, R.S., Powell, C.T., Corr, J.G., Fair, W.R., y Heston, W.D.W.:** Expression of the prostate-specific membrane antigen (PSM).: *Submitted to Cancer Research*.

11. **Horoszewicz, J.S., Leong, S.S., Kawinski, E., Karr, J.P., Rosenthal, H., Chu, T.M., Mirand, E.A, y Murphy, G.P.:** LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.*, 43:1809-1818, 1983.

12. **Soule, H.D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S., y Brennan, M.:** A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Can. Inst.*, 51:1409-1411, 1973.

13. **Hanahan, D.:** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166:557-580, 1983.

14. **Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A.R.:** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 74:5463-5467, 1977.

15. **Lundwall, A., y Lilja, H.:** Molecular cloning of a human prostate specific antigen cDNA. *FEBS Letters*, 214:317, 1987.

16. **Liotta, L.A., Kleinerman, J., y Saidel, G.M.:** Quantitative relationships of intravascular tumor cells, tumor vessels, and pulmonary metastases following tumor implantation. *Cancer Res*, 34:997-1003, 1974.

### *Cuarta Serie de Experimentos*

*La expresión del antígeno de membrana específico de la próstata (PSM) disminuye la estimulación mitogénica de las células agresivas de carcinoma prostático humano por la transferrina*

Muchos investigadores han sugerido una asociación entre la transferrina y el cáncer de próstata humano. Se ha mostrado que las secreciones prostáticas expresadas de pacientes con cáncer de próstata están enriquecidas con respecto a su contenido en transferrina y que las células de cáncer de próstata son ricas en receptores de la transferrina (J. Urol. 143, 381, 1990). Se ha mostrado que la transferrina obtenida de la médula ósea estimula selectivamente el crecimiento de células de cáncer de próstata agresivas (PNAS 89, 6197, 1992). Hemos publicado previamente la clonación del ADNc que codifica el antígeno PSM de 100 kDa (Cancer Res., 53, 208, 1993). El análisis de la secuencia de ADN ha mostrado que una parte de la región codificadora, del nucleótido 1.250 al 1.700, posee un 54% de homología con el receptor de la transferrina humano. Las células PC-3 no expresan el ARNm o la proteína PSM y presentan un crecimiento celular incrementado en respuesta a la transferrina, mientras que las células de cáncer de próstata LNCaP que expresan intensamente PSM presentan una respuesta muy débil a la transferrina. Para determinar si la expresión de PSM por las células de cáncer de próstata influye en su respuesta mitogénica a la transferrina, transfectamos de manera estable el ADNc de longitud completa de PSM en las células de cáncer de próstata PC-3. Se identificaron clones que expresaban mucho el ARNm de PSM mediante análisis Northern y la expresión de la proteína PSM se verificó mediante análisis Western utilizando el anticuerpo monoclonal anti-PSM 7E11-C5.3.

Plaqueamos  $2 \times 10^4$  células PC-3 o PC-3 transfectadas con PSM por pocillo en medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino y a las 24 horas se añadió a las células  $1 \mu\text{g}$  por ml de holotransferrina. Las células se contaron en el día 1 para determinar la eficacia del plaqueo y a los 5 días para determinar el efecto de la transferrina. Los experimentos se repitieron para verificar los resultados.

Observamos que las células PC-3 experimentaban un incremento medio del 275% respecto a los controles, mientras que las células LNCaP sólo se estimularon un 43%. Las cinéticas del crecimiento mostraron que las células PC-3 transfectadas con PSM crecieron un 30% más despacio que las células PC-3 nativas. Estos datos sugieren que la expresión de PSM en células agresivas metastásicas de cáncer de próstata humano reduce significativamente su respuesta mitogénica a la transferrina.

La utilización de vacunas terapéuticas que consisten en preparaciones de células tumorales que secretan citoquinas para el tratamiento del cáncer de próstata establecido se investigó en el modelo de adenocarcinoma prostático de rata Dunning R3327-MatLyLu. Sólo las preparaciones de células tumorales irradiadas que secretan IL-2 fueron capaces de curar animales con tumores establecidos subcutáneamente, y de suscitar memoria inmunológica que protege a los animales frente a otra exposición tumoral. La inmunoterapia fue menos eficaz cuando los tumores se indujeron ortotópicamente, pero sin embargo produjeron un resultado mejor, retardando significativamente y ocasionalmente previniendo la recurrencia de tumores después de la resección de la próstata cancerosa. La inducción de una respuesta inmune potente en animales con tumores frente al tumor MatLyLu no inmunogénico apoya la idea de que la inmunoterapia activa del cáncer de próstata puede tener beneficios terapéuticos.

# ES 2 276 390 T3

## REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en:

5 (a) un ácido nucleico que codifica un antígeno polipeptídico de membrana específico de la próstata humano que tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2;

10 (b) un ácido nucleico que tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 o un fragmento de éste que codifica un área antigénica frente a la que puede generarse un anticuerpo que es específico del antígeno de membrana específico de la próstata humano que tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2; y

15 (c) un ácido nucleico que tiene al menos 15 nucleótidos consecutivos de la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1, o la cadena complementaria de éste.

2. Un ácido nucleico que codifica un antígeno polipeptídico de membrana específico de la próstata humano que tiene la secuencia mostrada en SEQ ID NO:2.

20 3. El ácido nucleico de la reivindicación 1, en el que el área antigénica tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

(a) Asp-Glu-Leu-Lys-Ala-Glu (SEQ ID NO:35);

25 (b) Asn-Glu-Asp-Gly-Asn-Glu (SEQ ID NO:36);

(c) Lys-Ser-Pro-Asp-Glu-Gly (SEQ ID No:37);

30 (d) (i) Asp-Glu-Leu-Lys-Ala-Glu (SEQ ID NO:35); (ii) Asn-Glu-Asp-Gly-Asn-Glu (SEQ ID NO:36); y (iii) Lys-Ser-Pro-Asp-Glu-Gly (SEQ ID No:37);

(e) el dominio de membrana exterior de dicho antígeno de membrana específico de la próstata humano; y

(f) una secuencia de aminoácidos hidrofílica de dicho antígeno de membrana específico de la próstata humano.

35 4. El ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3, que comprende nucleótidos que tienen la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1.

5. El ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el ácido nucleico es ADN o ADNc.

40 6. El ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el ácido nucleico es ARN.

7. El ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 5 ó 6, unido de manera operativa a un promotor de la transcripción de ARN.

45 8. Un vector que comprende el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

9. El vector de la reivindicación 8, en el que el vector es un plásmido, cósmido bacteriófago u otro virus.

50 10. El vector de la reivindicación 9, en el que el vector se denomina P55A-PSM (ATCC 75294).

11. Un sistema anfitrión vector para la producción de un polipéptido, en el que el sistema anfitrión vector comprende el vector de cualquiera de las reivindicaciones 8, 9 ó 10 y una célula anfitriona adecuada.

55 12. El sistema anfitrión vector de la reivindicación 11, en el que la célula anfitriona adecuada es una célula bacteriana, célula de levadura, célula de insecto o célula de mamífero.

60 13. Un método para producir un polipéptido que comprende crecer el sistema anfitrión vector de cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12 en condiciones adecuadas que permitan la producción del polipéptido y la recuperación del polipéptido así producido.

14. Una célula de mamífero que comprende el vector de cualquiera de las reivindicaciones 8, 9 ó 10.

65 15. Un polipéptido con la secuencia del antígeno de membrana específico de la próstata humano mostrada en SEQ ID NO:2 o un área antigénica que es una secuencia de aminoácidos hidrofílica de dicho antígeno de membrana específico de la próstata humano, en el que el polipéptido puede utilizarse para generar anticuerpos que son específicos de dicho antígeno de membrana específico de la próstata humano,

## ES 2 276 390 T3

siempre que el área antigénica no consista en la secuencia mostrada en SEQ ID NO:35.

16. El polipéptido de la reivindicación 15, en el que el polipéptido consiste en la secuencia del antígeno de membrana específico de la próstata humano mostrada en SEQ ID NO:2 o un área antigénica que es una secuencia de aminoácidos hidrofílica de dicho antígeno de membrana específico de la próstata humano frente a la que pueden generarse anticuerpos que son específicos de dicho antígeno de membrana específico de la próstata humano,

siempre que el área antigénica no consista en la secuencia mostrada en SEQ ID NO:35.

17. Un polipéptido con la secuencia del antígeno de membrana específico de la próstata humano mostrada en SEQ ID NO:2.

18. Un anticuerpo monoclonal dirigido frente al antígeno de membrana específico de la próstata humano, mostrándose la secuencia de dicho antígeno en SEQ ID NO:2.

19. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 18 que se une a un área antigénica del antígeno de membrana específico de la próstata humano seleccionada del grupo que consiste en:

(a) Asp-Glu-Leu-Lys-Ala-Glu (SEQ ID NO:35);

(b) Asn-Glu-Asp-Gly-Asn-Glu (SEQ ID NO:36);

(c) Lys-Ser-Pro-Asp-Glu-Gly (SEQ ID No:37);

(d) el dominio de membrana exterior de dicho antígeno de membrana específico de la próstata humano; y

(e) una secuencia de aminoácidos hidrofílica de dicho antígeno de membrana específico de la próstata humano.

20. El anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 18 ó 19, **caracterizado** adicionalmente como capaz de unirse a la superficie de una célula de cáncer de próstata.

21. Una composición que comprende el anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 19 a 20.

22. La composición de la reivindicación 21, que comprende además un agente conjugado con el anticuerpo.

23. La composición de la reivindicación 22, en la que el agente es un agente de imagen, un agente terapéutico, una toxina o un agente citotóxico.

24. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23 que comprende un vehículo aceptable desde un punto de vista farmacéutico.

25. La composición de la reivindicación 21, que es una composición farmacéutica que comprende un vehículo aceptable desde un punto de vista farmacéutico.

26. El anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, o una composición de cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25, para utilizarse en la terapia o diagnóstico del cáncer de próstata.

27. Utilización de un anticuerpo monoclonal de cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20 o de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23 para la fabricación de una composición farmacéutica para tratar el cáncer de próstata en un paciente humano.

28. Utilización de una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25 para la preparación de una composición de diagnóstico para obtener imágenes del cáncer de próstata en un sujeto.

29. Un inmunoensayo para determinar la cantidad de antígeno de membrana específico de la próstata humano en una muestra biológica que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto las muestras biológicas con al menos un anticuerpo monoclonal de una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20 o con la composición de cualquiera de las reivindicaciones 22 ó 23 para formar un complejo entre dicho anticuerpo y cualquier antígeno de membrana específico de la próstata humano presente en la muestra, y

(b) determinar la cantidad del antígeno de membrana específico de la próstata humano en dicho complejo, de forma que se determina así la cantidad de antígeno de membrana específico de la próstata humano en dicha muestra biológica.

## ES 2 276 390 T3

30. Utilización de un ácido nucleico marcado de la reivindicación 1(c) para la preparación de una composición de diagnóstico para detectar la expresión de un antígeno de membrana específico de la próstata humano en una célula o sección de tejido en una muestra.

5 31. La utilización de la reivindicación 30, en la que la muestra es sangre, nódulos linfáticos o médula ósea.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1

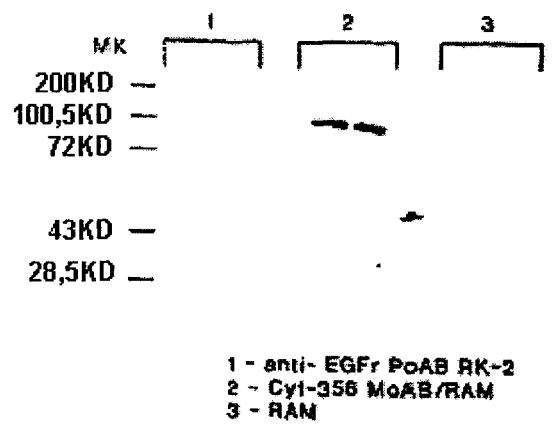


FIGURA 2A

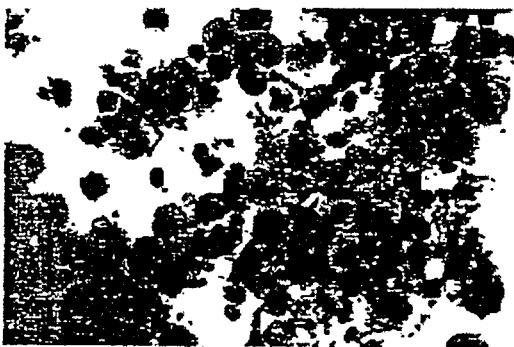


FIGURA 2B

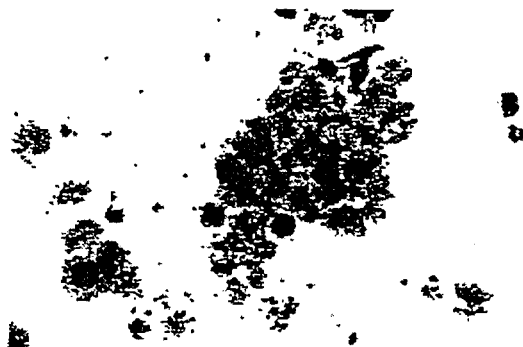


FIGURA 2C

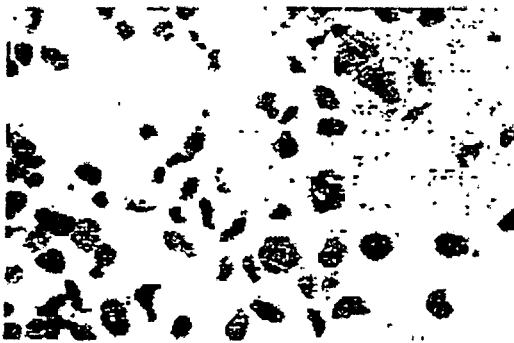
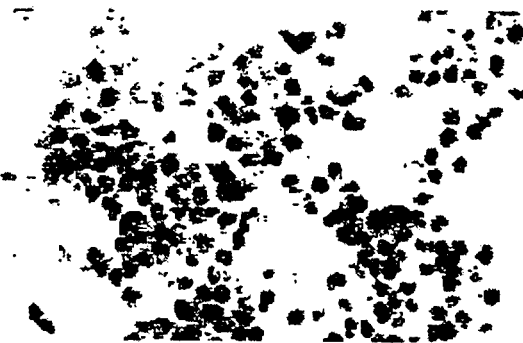
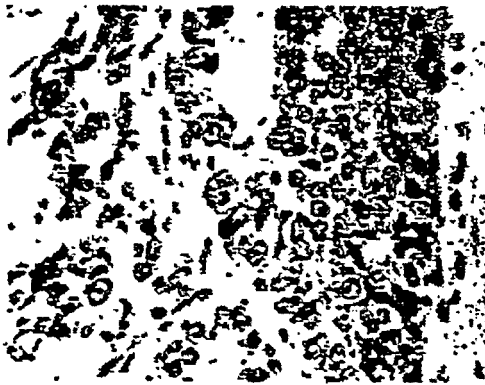


FIGURA 2D



**FIGURA 3A**



**FIGURA 3B**



**FIGURA 3C**



**FIGURA 3D**

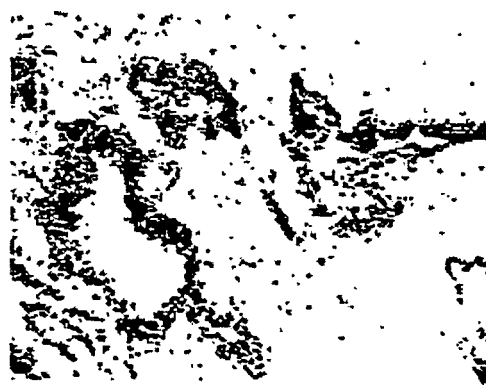


FIGURA 4

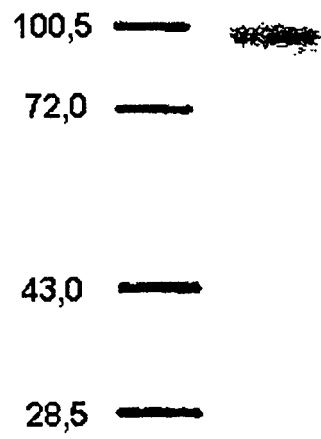


FIGURA 5

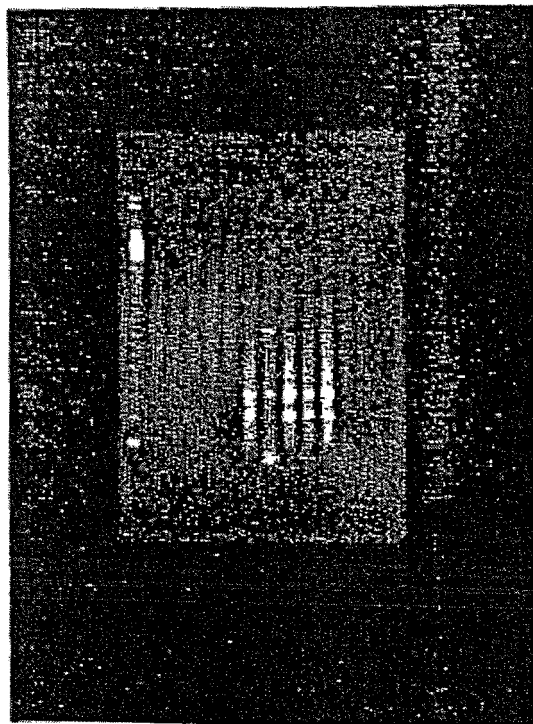


FIGURA 6A

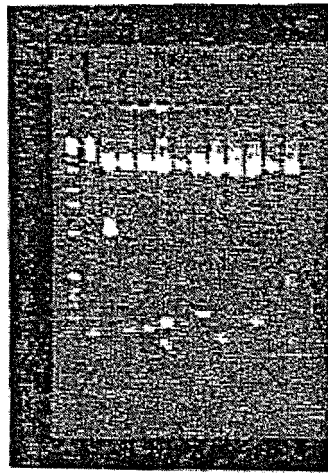


FIGURA 6B

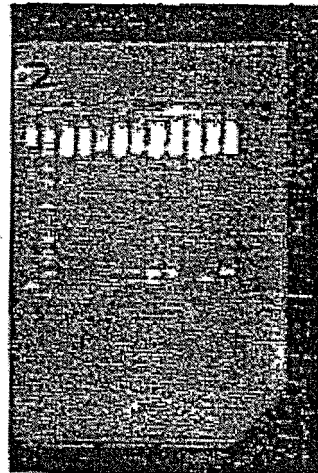


FIGURA 7

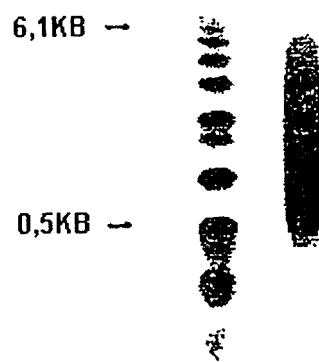


FIGURA 8

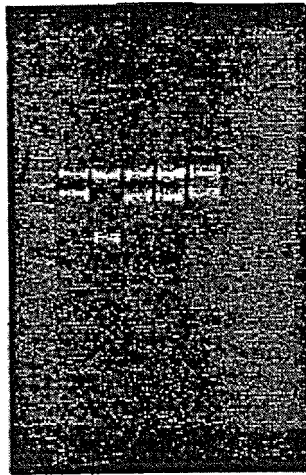


FIGURA 9

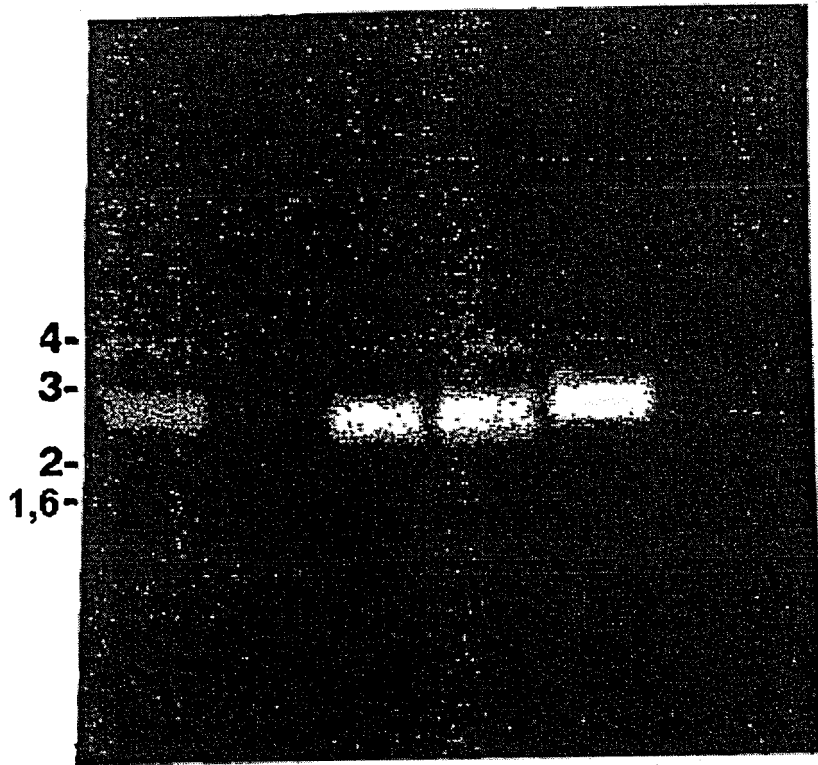


FIGURA 10

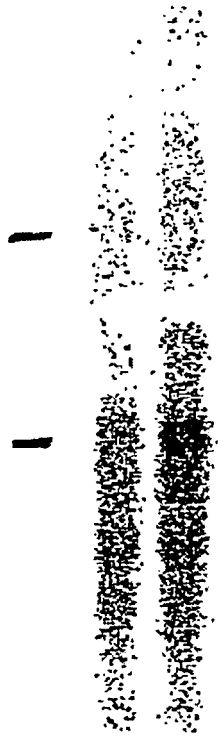


FIGURA 11

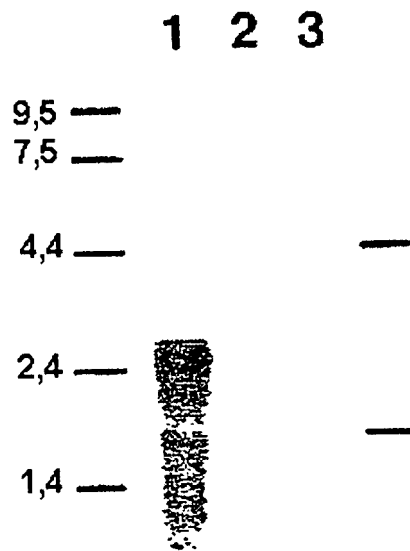


FIGURA 12A

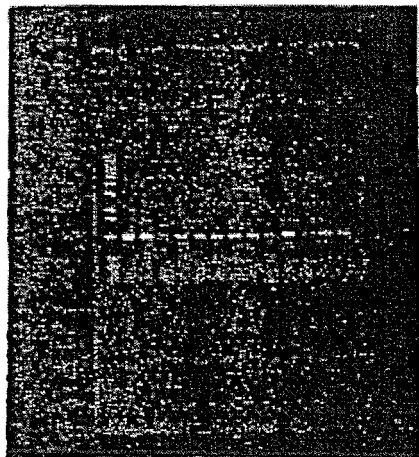


FIGURA 12B

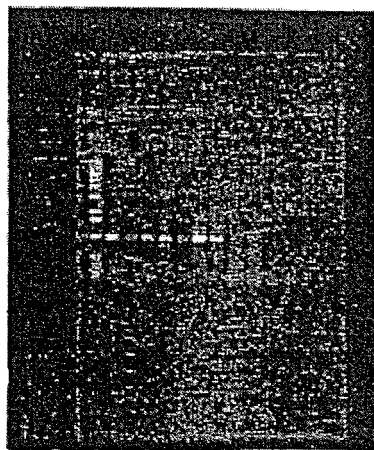


FIGURA 13

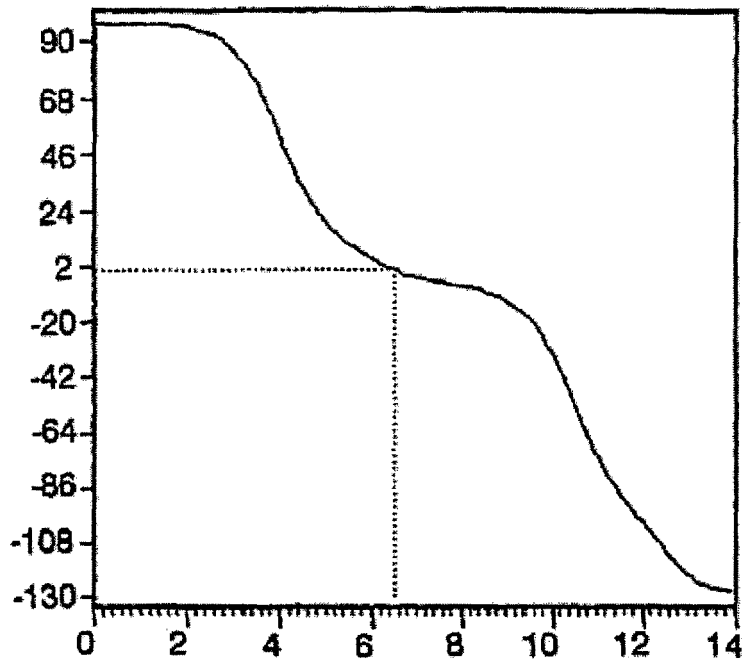






FIGURA 14-3

451 E E S S E T T E E E E E E N N N N N N N N N N N N  
481 N S S N N N N N N N N T T T T S S S S T E E E E E  
511 E E E E S S S S E E E E N N N N N N T T S S T E S T  
541 T E T T T S S S E E E E E E N N N N N N N N N N  
571 N N N N N N N N E E E E E E N N N N E E E T N N  
601 N N N N N N N N E E E E E E N S N N N T T S S E E  
631 N N N N N N N N N N N N N N N N T T T S S E E E  
661 E E E N N N N N N N N N N N N V E T T S S T E E E E  
691 E E E T S S S S T E E E E T E N N N N N N N S S  
721 S N N N N N N N E E E E E E N N N N N N N N N N





FIGURA 14-5

```

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-->>-----***XXXXXXXXXX-X*--
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-->>-----***XXXXXXXXXX-X*--

110      120      130      140      150
|         |         |         |         |
KEFGLDSVELAHYDVLLSYPNKTHPNYISINEDGNEIFNTSLFEPFPPG
->>***XXXXXXXX-->>***----->>***X----->>***>>
->>***XXXXXXXX-->>***----->>***X----->>***>>

160      170      180      190      200
|         |         |         |         |
YENVSDIVPPFSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERDMKINCSGKI

```





FIGURA 14-8

```

LYHSVYETVELVEKFDPMFKYHLITVAQVRGGMVFELANSIVLFFDCRDY
-----XXXXXXXXXXXXXXXXX-X-----XXXXXXXX----->XXX
-----XXXXXXXXXXXXXXXXX-X-----XXXXXXXX----->XXX
        610      620      630      640      650
AVVLRKYADKIYSISMKHPQEMKTYSVSFDLSLFSAVKNFTEIASKFSERL
XXXXXXXXXX-----X*XXXXX-----XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXX-----X*XXXXX-----XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
        660      670      680      690      700
QDFDKSNPIVLRMMNDQLMCLERAFIDPLGLPDRPFYRHHVIYAPSSHNKY
XX>>>*>-----XXXXXXXXXX-->>*>----->***>
XX>>>*>-----XXXXXXXXXX-->>*>----->***>
        710      720      730      740      750
AGESFPGIYDALFDIESKVDPSKANGEVKRQIYVAAFTVQAAAETLSEVA
----->-----XXXXXXXXXX-----XXXXXXXXXXXXXXXXXX
----->-----XXXXXXXXXX-----XXXXXXXXXXXXXXXXXX

```

FIGURA 15A

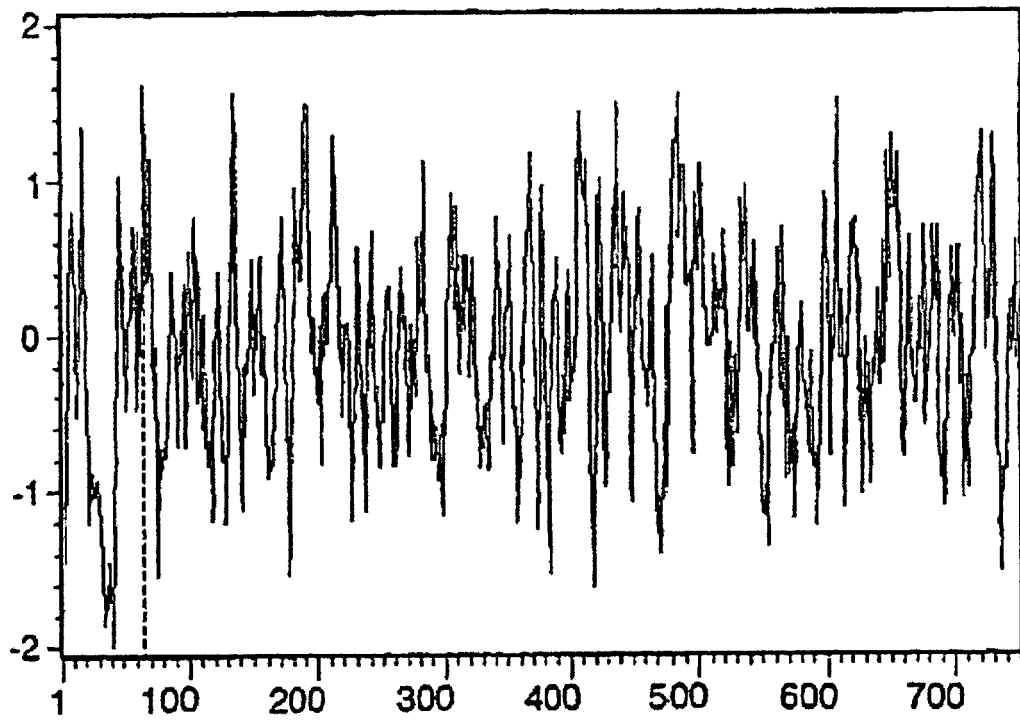


FIGURA 15B

\*\*\*\*\*  
 \* PREDICCIÓN DE LOS DETERMINANTES ANTIGÉNICOS \*  
 \*\*\*\*\*

Realizada en la secuencia PSMANTIGEN.

Número total de restos: 750.

Análisis realizado en la secuencia completa.

El método utilizado es el de Hopp y Woods.

La longitud media de los grupos es: 6 aminoácidos.

-> Este es el valor recomendado por los autores <-

Los tres puntos más altos de hidrofiliidad son:

- (1) Ah= 1,62 : De 63 a 68 : Asp-Glu-Leu-Lys-Ala-Glu
- (2) Ah= 1,57 : De 132 a 137 : Asn-Glu-Asp-Gly-Asn-Glu
- (3) Ah= 1,55 : De 482 a 487 : Lys-Ser-Pro-Asp-Glu-Gly

Ah significa: Hidrofiliidad media.

Obsérvese que en un grupo de proteínas control sólo el punto más alto se asignó en el 100% de los casos a un grupo antigénico conocido. El segundo y tercer puntos dieron una proporción de predicciones incorrectas del 33%.

FIGURA 16-1

Las mejores puntuaciones son:  
 CHKTFFER ARNm de G.gallus del receptor de la transferrina      initn    203    120    321    opt    321  
 RATTRFR ARNm del receptor de la transferrina de rata, extremo 3'.      164    164    311    311  
 HUMTFRR ARNm del receptor de la transferrina humano, cd completo      145    145    266    266

CHKTFFER ARNm de G.gallus del receptor de la transferrina      203    120    321  
 51,9% de identidad en 717 nt superpuestos

1.020    1.030    1.040    1.050    1.060    1.070  
**pmsgen** TGTCAGCGTGGAATAATCCTAAATCTGAAATGGTGCAGGAGACCCCTCTCACACCAGGTTA

CHKTFFE TACACTTATCCCATTCCGGACATGCCACCTTGGAACTGGAGACCCCTTACACCCAGGCTT  
 990    1.000    1.010    1.020    1.030    1.040

1.080    1.090    1.100    1.110    1.120    1.130  
**pmsgen** CCCAGCAAATGAAATATGCTTATAGCGCGTGGAAATGTCAGAGGCTGTGGTCTTCCAAAGTAT

CHKTFFE CCCTTCGTTCAACCACACCCA---GTTTCCACCAGTTGAATCTTCAGGACTACCCACAT  
 1.050    1.060    1.070    1.080    1.090    1.100

1.140    1.150    1.160    1.170    1.180    1.190  
**pmsgen** TCCGTTCATCCAAATGGATACTATGATGCACAGAGCTCCTAGAAAAAATGGTGGCTC

CHKTFFE TGCTGTTCAGACCATCTCTAGCAGTGCAGCAGCCAGGCTGTTCAGCAAATGGATGGAGA  
 1.110    1.120    1.130    1.140    1.150    1.160

FIGURA 16-2

```

1.200      1.210      1.220      1.230      1.240      1.250
pmsgen AGCACCCAGATAGCAGCTGGAGAGGAAGTCTCAAAGTGCCCTACAAATGTTGGACCCTGG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
CHKTFE CACATGCTCTGA-AG--GTTGGAAAGGTGCGATCCA---TTCCTGTAAGGT--GAC--AA
      1.170      1.180      1.190      1.200      1.210

1.260      1.270      1.280      1.290      1.300      1.310
pmsgen CTTTACTGGAAACTTTTCTACACAATAAAGTCAAGATGCACATCCACTCTACCCAATGAAGT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
CHKTFE CAAAGCAGGAGA----GCCAGA-TAATGGTGAAACTAGATGTGAACAATTCCTCATGAAAGA
      1.220      1.230      1.240      1.250      1.260

1.320      1.330      1.340      1.350      1.360      1.370
pmsgen GACAAGAATTTACAAATGTGATAGGTACTCTCAGAGGAGCAGTGGAAACCAGACAGATATGT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
CHKTFE CAGGAAGATTCTGAACATCTTCGGTGTATCCAGGGATTTGAAGAACCTTGAATCGGTATGT
      1.270      1.280      1.290      1.300      1.310      1.320

1.380      1.390      1.400      1.410      1.420      1.430
pmsgen CATTCCTGGAGGTCACCCGGACTCATGGGTGTTTGGTGTATTGACCCTCAGAGTGGAGC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
CHKTFE TGTGATGGAGCCAGAGAGACTCCTGGGGCCAGGAGTGGCTAAAGCTGGCACTGGAAC
      1.330      1.340      1.350      1.360      1.370      1.380

```





FIGURA 16-5

RATTRFR ARNm del receptor de transferrina de rata, extremo 3' 164 164 311  
 55,5% de identidad en 560 nt superpuestos

```

    1.210      1.220      1.230      1.240      1.250
pmsgen CCACCAGATAGCAGCTGGAGAGGAAGTCTCAAAGTGCCCTACAAATGTTGGACCTGGCTT~
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
RATTRF TGCAGAAAAGCTATTCAAAACAATGGAAGGAAACTGTCCCTCCTAGTTGGAAATATAGATTC
    610      620      630      640      650      660

    1.260      1.270      1.280      1.290      1.300      1.310
pmsgen -TACTGGAAACTTTTCTACACAAAAGTCAAGATGCACATC-CACTCT-ACCAATG----
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
RATTRF CTCATGTAAGCTGGAACTTTCACAGAAATCAAATGTGGAAGCTCACTGTGAACAATGTACT
    670      680      690      700      710      720
    
```







FIGURA 16-9

HUMTFRR ARNm del receptor de la transferrina humano, cd completo 145 145 266  
 54,3% de identidad en 464 nt superpuestos

```

1.230      1.240      1.250      1.260      1.270
pmsgen AGGAAGTCTCAAAGTGGCCCTACAAATGTTGGACCTGGCTTTAC--TGGAAACTTTTCTACAC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
HUMTFR TATGGAAGGAGACTGTCCCTCTGACTGGAAAACAGACTCTACATGTAGGATGGTAAACCTC
1.140      1.150      1.160      1.170      1.180      1.190

1.280      1.290      1.300      1.310      1.320      1.330
pmsgen AAAAAGTCAAGATGCACATC-CACTCT-ACCAATG-----AAGTGACAAGAAATTACAA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
HUMTFR AGAAAGCAAAGAAATGTGAAGCTCAGCTGAGCAATGTGCTGAAAGAGATATAAAATTTCTTAA
1.200      1.210      1.220      1.230      1.240      1.250

1.340      1.350      1.360      1.370      1.380      1.390
pmsgen TGTGATAGGTACTCTCAGAGGAGCAGTGGAAACCAGACAGATATGTCAATCTGGGAGGTCA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
HUMTFR CATCTTTGGAGTTATTAAGGCTTTGTAGAACCCAGATCACTATGTTGTAGTTGGGGCCCA
1.260      1.270      1.280      1.290      1.300      1.310

1.400      1.410      1.420      1.430      1.440      1.450
pmsgen CCGGGACTCATGGGTGTTTGGTGGTATTGACCCCTCAGAGT-GGAGCAGCTGTTGTTTCATG
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
HUMTFR GAGAGATGCATGGGGCCCTGGAGCTGCAAAATC-CGGTGPAGGCACAGCTCTCCATTGA
1.320      1.330      1.340      1.350      1.360      1.370
    
```

FIGURA 16-10

```

1.460      1.470      1.480      1.490      1.500
pmsgen AAATTG---TGAGGAGCTTTGGAAACACTGAAAAAGGAAGGGTGGAGACCTAGAAACAA
      :: :: :: :: :: :: :: :: :: X :: :: :: :: :: :: ::
1.380      1.390      1.400      1.410      1.420      1.430
HUMTFR AACTTGCCAGATGTTCTCAGATATGGTCTTFAAAAGATGGGTTTCAGCCCCAGCAGAAGCA
      :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::
1.510      1.520      1.530      1.540      1.550      1.560
pmsgen TTTTGTTCGAAGCTGGGATGCAGAGAATTGGTCTTCTTGGTTCCTACTGAGTGGGCAG
      :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::
1.440      1.450      1.460      1.470      1.480      1.490
HUMTFR TTATCTTTGCCAGTTGGAGTCTGGAGACTTTGGATCGGTTGGTGCCACTGAAATGGCTAG
      :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::
1.570      1.580      1.590      1.600      1.610      1.620
pmsgen A-GGAGAAATCAAGACTCCTTCAAGAGCGTGGCGTTATATAATTAATGCTGACTCATCT
      :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::
1.500      1.510      1.520      1.530      1.540      1.550
HUMTFR AGGATACCTTTCGTC-CCTGCAATTAAGGCTTTCACCTTATATAATTAATCTGGATAAAGCG
      :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::
1.630      1.640      1.650      1.660      1.670      1.680
pmsgen ATAGAAGGAAACTACACTCTGAGAGTTGATGTGTACACCGCTGATGTACA-GCTTGGT-AC
      :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::
1.560      1.570      1.580      1.590      1.600      1.610
HUMTFR GTTCTTGGTACCAGCAACTTCAAGGTTTCTGCCAGCCCCACTGTTGTATACCGCTTATTGAG
      :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::

```



FIGURA 17A

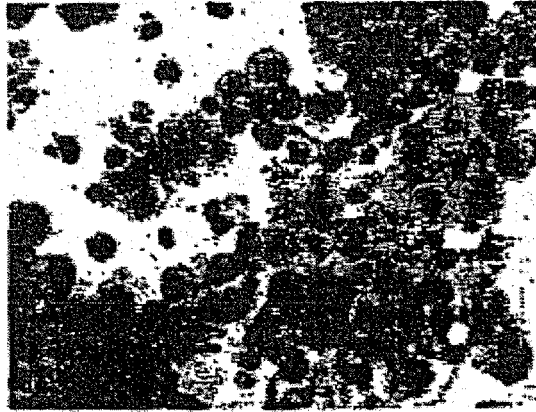


FIGURA 17B

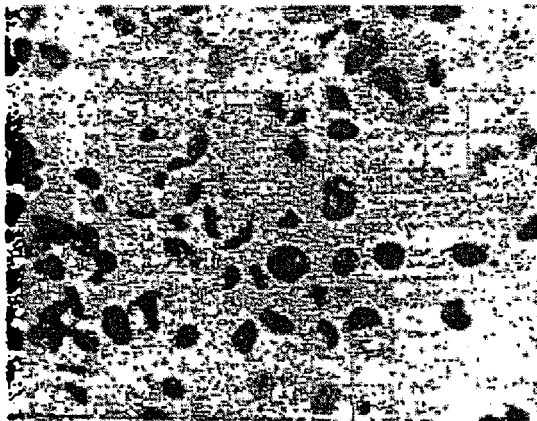


FIGURA 17C

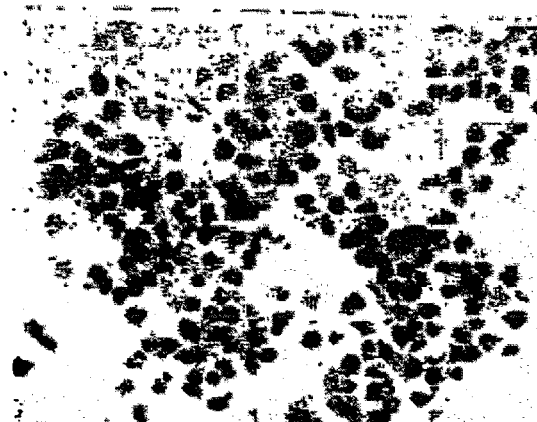


FIGURA 18

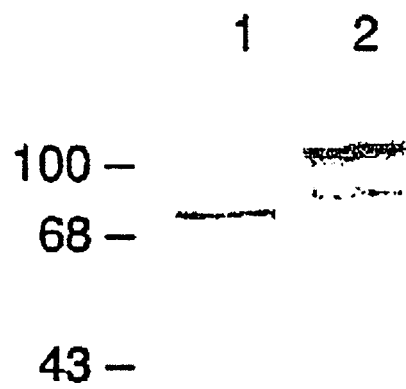


FIGURA 19

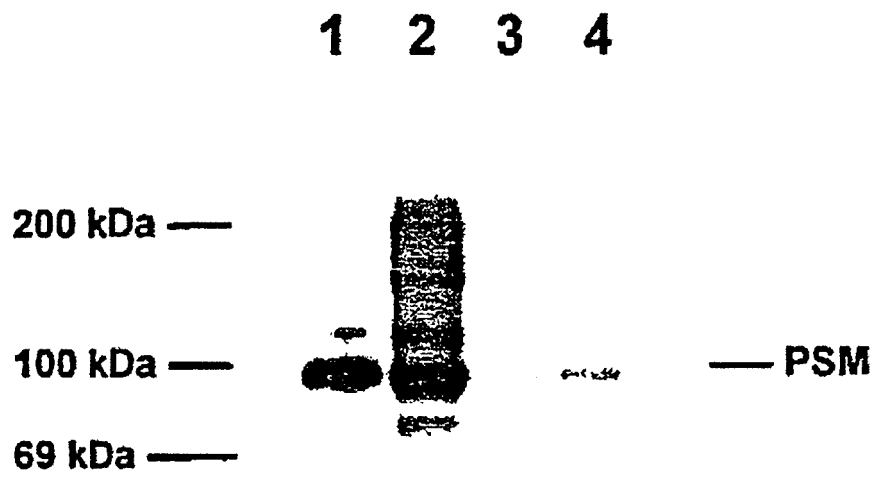


FIGURA 20

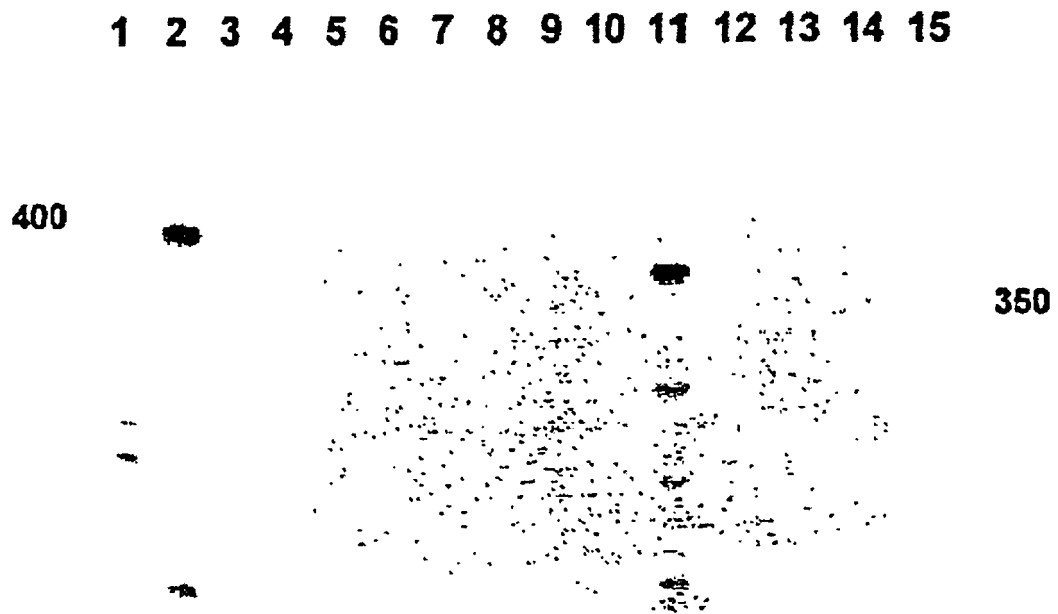


FIGURA 21

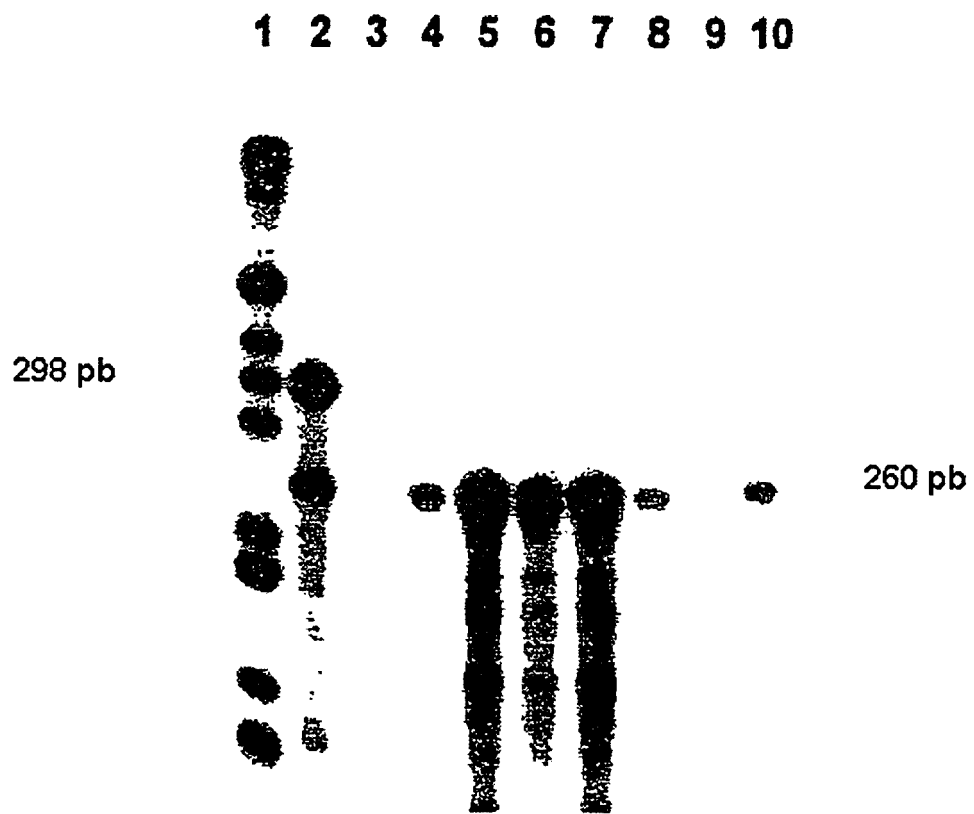


FIGURA 22

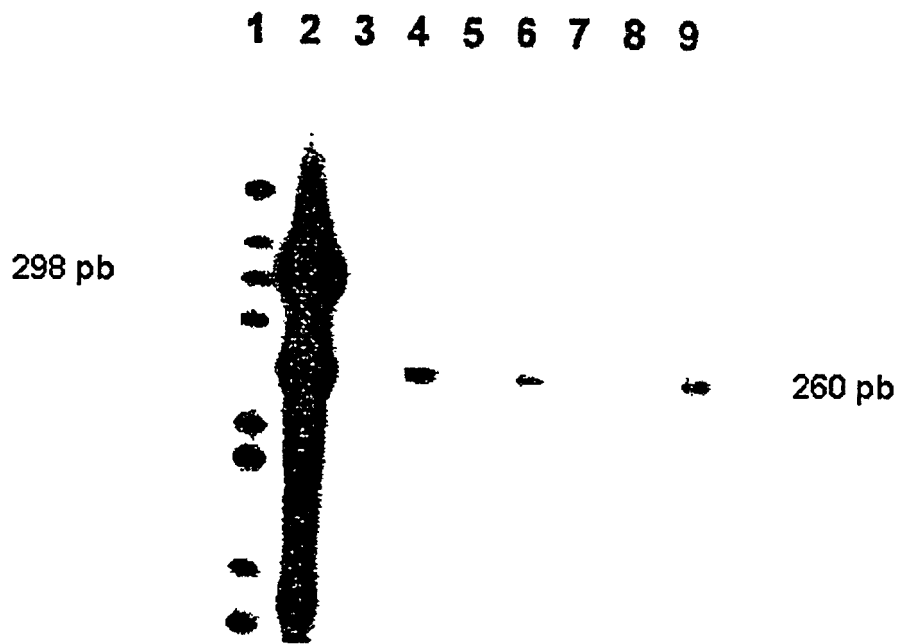


FIGURA 23

LÍNEA/TIPO CELULAR	REGIÓN 11p11.2-13	METASTÁSICO	ARN de PSM DETECTADO	ADN de PSM DETECTADO
LNCap			++	ND
PRÓSTATA HUMANA			++	ND
A9 (FIBROSARCOMA)	NO	NO	-	-
A9(11) (A9+HUM. 11)	SÍ	NO	-	REPETIR
AT6.1 (PRÓSTATA de RATA)	NO	SÍ	-	-
AT6.1-11-c11	SÍ	NO	+	++
AT6.1-11-c12	NO	SÍ	-	-
R1564 (MAMA de RATA)	NO	SÍ	-	-
R1564-11-c14	SÍ	SÍ	-	+
R1564-11-c15	SÍ	SÍ	-	REPETIR
R1564-11-c16	SÍ	SÍ	-	ND
R1564-11-c12	SÍ	SÍ	ND	+

FIGURA 24A

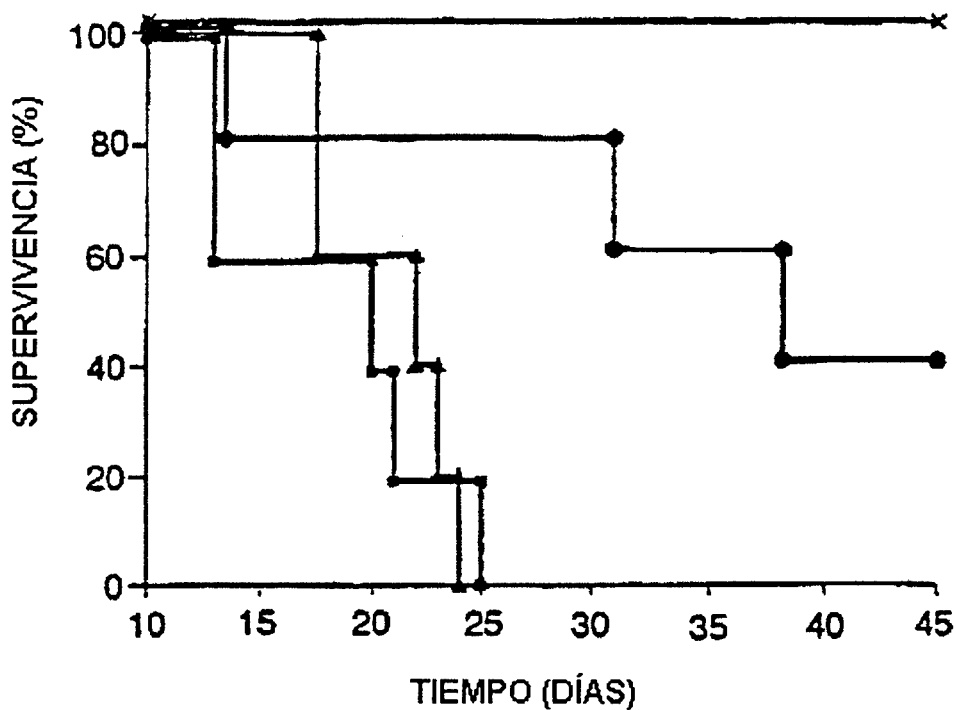


FIGURA 24B

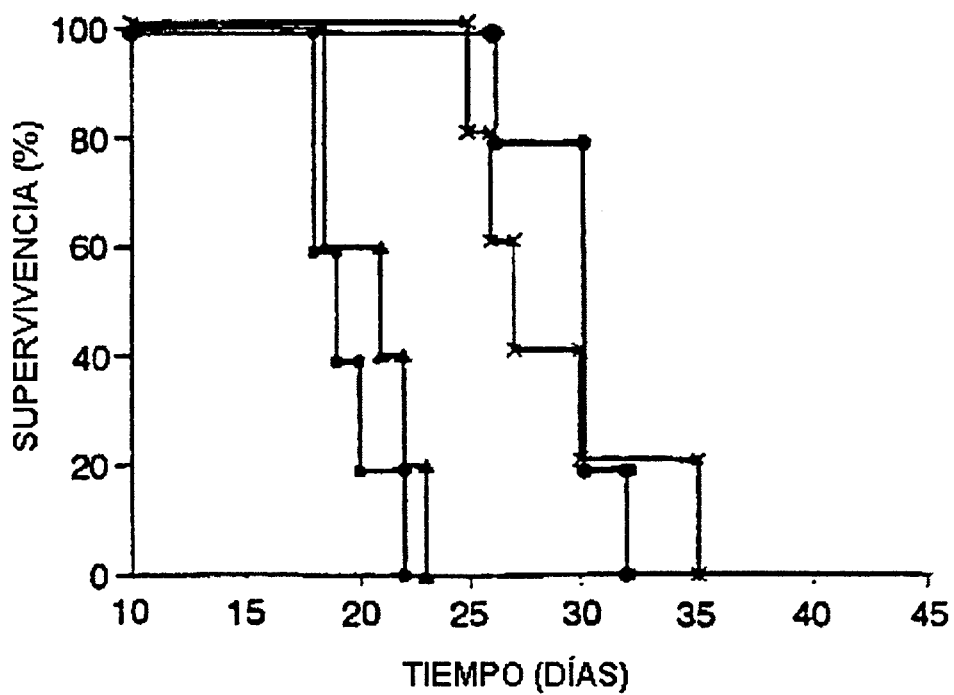


FIGURA 25A

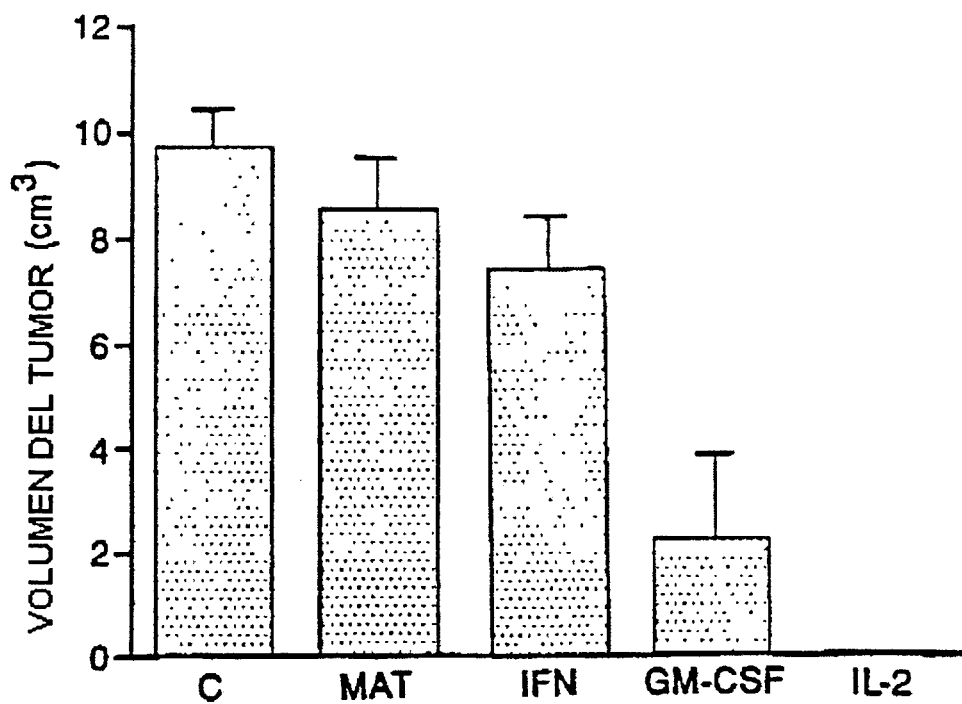


FIGURA 25B

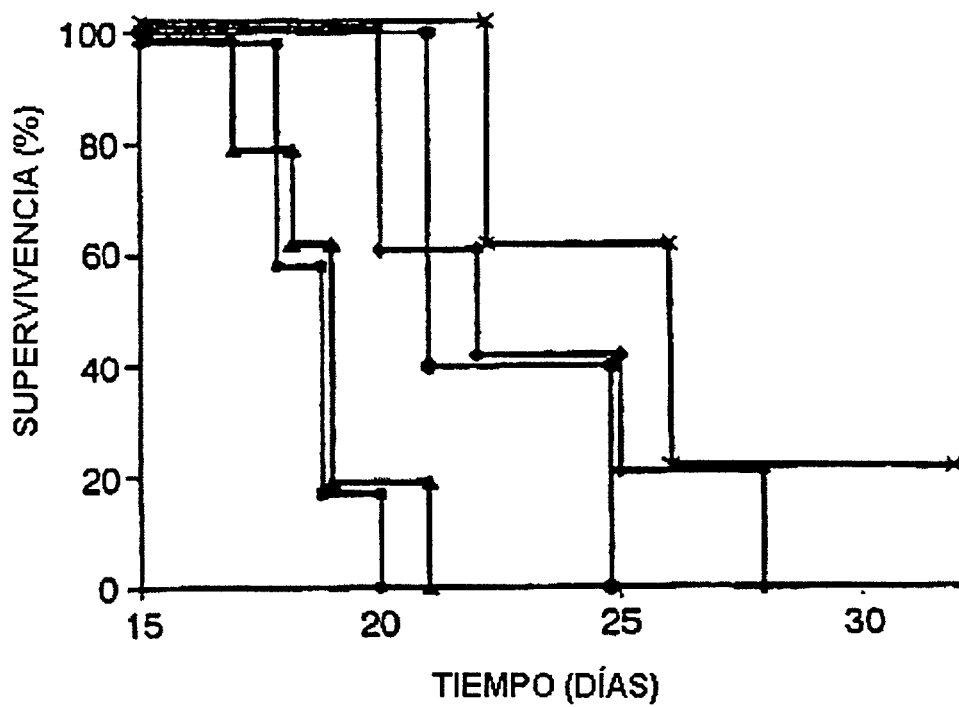


FIGURA 26

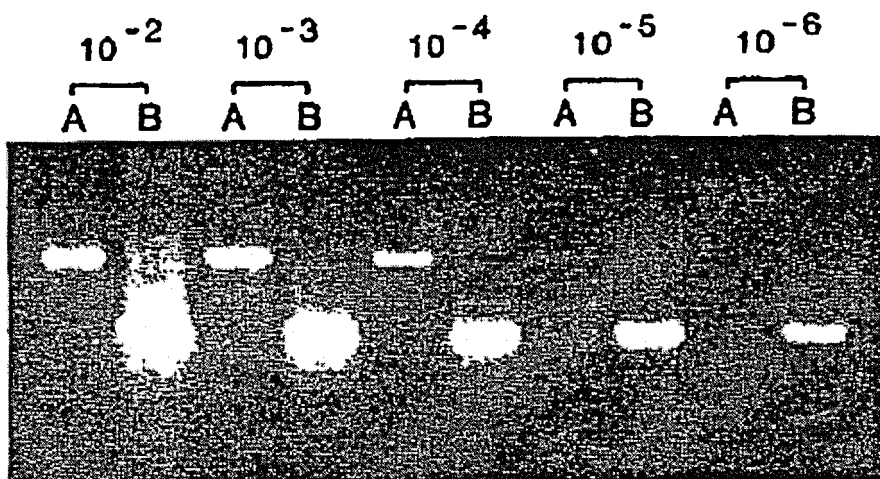


FIGURA 27

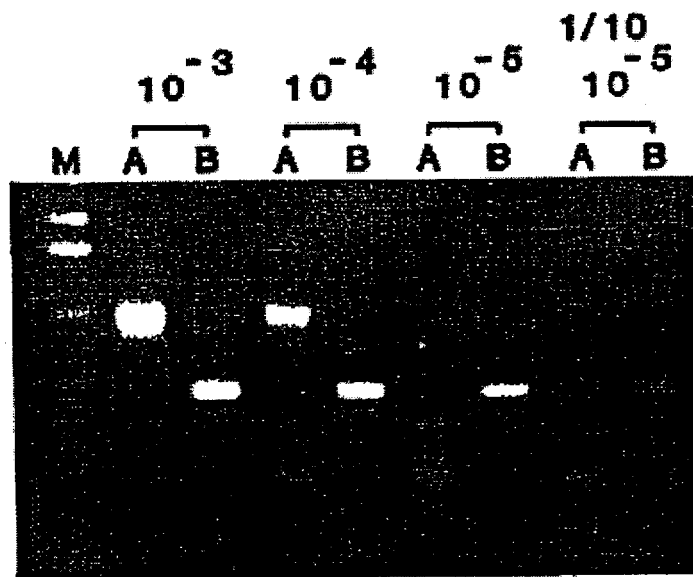


FIGURA 28

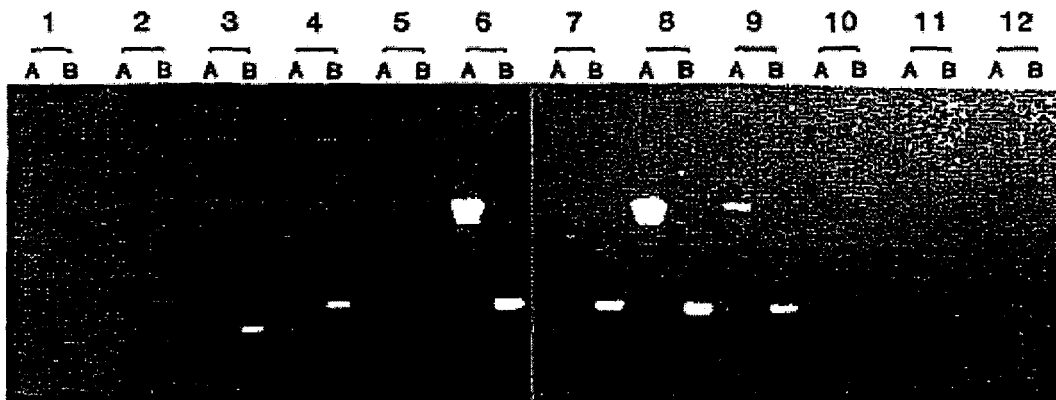


FIGURA 29

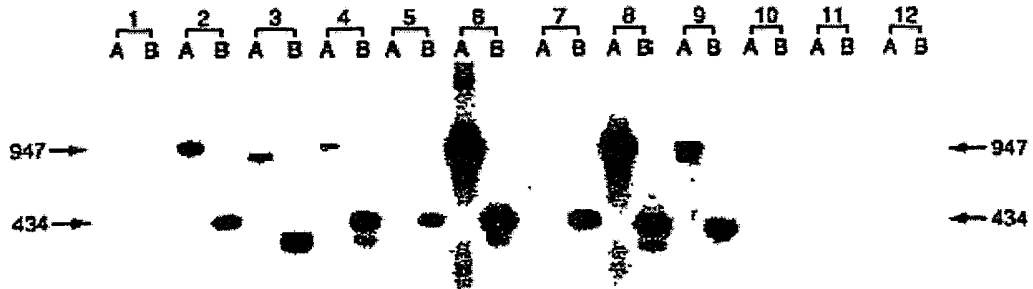


FIGURA 30

Paciente	Estadio	Tratamiento	PSA	PAP	PSA-PCR	PSM-PCR
1	T2NxMo	Ninguno	8,9	0,7	-	+
2	T2NoMo	RRP 7/93	6,1	-	-	+
3	T2CNoMo	PLND 5/93	4,5	0,1	-	+
4	T2BNoMo	RRP 3/92	NMA	0,4	-	+
5	T3NxMo	Proscar + Flutamida	51,3	1,0	-	+
6	Recur T3	I-125 1986	54,7	1,4	-	+
7	T3ANoMo	RRP 10/92	NMA	0,3	-	+
8	T3NxMo	XRT 1987	7,5	0,1	-	-
9	T3NxMo	Proscar + Flutamida	35,4	0,7	-	-
10	D2	S/P XRT Flutamida +Emcyt	311	4,5	+	+
11	D2	RRP 4/91 Lupron 10/92 Velban + Emcyt 12/92	1.534	1,4	+	+
12	T2NoMo	RRP 8/91	NMA	0,5	-	+
13	T3NoMo	RRP 1/88 Lupron + Flutamida 5/92	0,1	0,3	-	-
14	D1	PLND 1989 XRT 1989	1,6	0,4	-	-
15	D1	Proscar + Flutamida	20,8	0,5	-	-
16	T2CNoMo	RRP 4/92	0,1	0,3	-	-

# ES 2 276 390 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

### (1) INFORMACIÓN GENERAL

- 5 (i) SOLICITANTE: Israeli, Ron S.  
Heston, Warren D.W.  
Fair, William R.
- 10 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: ANTÍGENO DE MEMBRANA ESPECÍFICO DE LA PRÓSTATA
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 38
- (iv) DIRECCIÓN POSTAL:
- 15 (A) DESTINATARIO: Cooper & Dunham  
(B) CALLE: 30 Rockefeller Plaza  
(C) CIUDAD: Nueva York  
(D) ESTADO: Nueva York
- 20 (E) PAÍS: Estados Unidos de América  
(F) CÓDIGO POSTAL: 10112
- (v) FÓRMA DE LECTURA EN EL ORDENADOR:
- 25 (A) TIPO DE MEDIO: Disquete  
(B) ORDENADOR: IBM PC compatible  
(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS  
(D) PROGRAMA INFORMÁTICO: PatentIn Release #1.0, Versión #1.25
- 30 (vi) DATOS ACTUALES DE LA SOLICITUD
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD:  
(B) FECHA DE CLASIFICACIÓN:  
35 (C) CLASIFICACIÓN:
- (viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:
- 40 (A) NOMBRE: White, John P.  
(B) NÚMERO DE REGISTRO: 28,678  
(C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 1747/41426
- (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:
- 45 (A) TELÉFONO: (212) 977-9550  
(B) TELEFAX: (212) 664-0525  
(C) TELEX: 422523 COOP UI

### 50 (2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 55 (A) LONGITUD: 2.653 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE CADENA: doble  
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- 65 (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

# ES 2 276 390 T3

(F) TIPO DE TEJIDO: Carcinoma

(vii) FUENTE PRINCIPAL:

(B) CLON: Antígeno de Membrana Específico de la Próstata

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 262..2511

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:1:

5	CTCAAAGGG GCGGGATTTC CTTCTCCTGG AGGCAGRTGT TGCCCTCTCTC TCTCGCTCGG	60
15	ATTGGTTCCAG TGCACCTCAG AACCACTGCT GTGGTGGAGA AACTGGACCC CAGGTCTGGA	120
	GCGAATTCCA GCCTGCAGGG CTCGATAAGCG AGGCATTAGT GAGATTGAGA GAGACTTTAC	180
20	CCCCGCCGTGG TGGTGGAGG GCGGCGAGTA GAGCAGCAGC ACAGGCGCGG GTCCCGGGAG	240
25	GCCGGCTCTG CTCGCGCGGA G ATG TGG AAT CTC CTT CAC GAA ACC GAC TCG Met Trp Asn Leu Leu His Glu Thr Asp Ser 1 5 10	291
30	GCT GTG GCC ACC GCG CGC CGC CCG CGC TGG CTG TGC GCT GGG GCG CTG Ala Val Ala Thr Ala Arg Arg Pro Arg Trp Leu Cys Ala Gly Ala Leu 15 20 25	339
35	GTG CTG GCG GGT GGC TTC TTT CTC CTC GGC TTC CTC TTC GGG TGG TTT Val Leu Ala Gly Phe Phe Leu Leu Gly Phe Leu Phe Gly Trp Phe 30 35 40	387
40	ATA AAA TCC TCC AAT GAA GCT ACT AAC ATT ACT CCA AAG CAT AAT ATG Ile Lys Ser Ser Asn Glu Ala Thr Asn Ile Thr Pro Lys His Asn Met 45 50 55	435
45	AAA GCA TTT TTG GAT GAA TTG AAA GCT GAG AAC ATC AAG AAG TTC TTA Lys Ala Phe Leu Asp Glu Leu Lys Ala Glu Asn Ile Lys Lys Phe Leu 60 65 70	483
50	TAT AAT TTT ACA CAG ATA CCA CAT TTA GCA GGA ACA GAA CAA AAC TTT Tyr Asn Phe Thr Gln Ile Pro His Leu Ala Gly Thr Glu Gln Asn Phe 75 80 85 90	531
55	CAG CTT GCA ARG CAA ATT CAA TCC CAG TGG AAA GAA TTT GGC CTG GAT Gln Leu Ala Lys Gln Ile Gln Ser Gln Trp Lys Glu Phe Gly Leu Asp 95 100 105	579
60	TCT GTT GAG CTA GCA CAT TAT GAT GTC CTG TTG TCC TAC CCA AAT AAG Ser Val Glu Leu Ala His Tyr Asp Val Leu Leu Ser Tyr Pro Asn Lys 110 115 120	627
65	ACT CAT CCC AAC TAC ATC TCA ATA ATT AAT GAA GAT GGA AAT GAG ATT Thr His Pro Asn Tyr Ile Ser Ile Ile Asn Glu Asp Gly Asn Glu Ile 125 130 135	675
70	TTC AAC ACA TCA TTA TTT GAA CCA CCT CCT CCA GGA TAT GAA AAT GTT Phe Asn Thr Ser Leu Phe Glu Pro Pro Pro Pro Gly Tyr Glu Asn Val 140 145 150	723
75	TCG GAT ATT GTA CCA CCT TTC AGT GCT TTC TCT CCT CAA GGA ATG CCA Ser Asp Ile Val Pro Pro Phe Ser Ala Phe Ser Pro Gln Gly Met Pro 155 160 165 170	771

ES 2 276 390 T3

5	GAG GGC GAT CTA GTG TAT GTT AAC TAT GCA CGA ACT GAA GAC TTC TTT Glu Gly Asp Leu Val Tyr Val Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp Phe Phe 175	819
10	AAA TTG GAA CCG GAC ATG AAA ATC AAT TGC TCT GGG AAA ATT GTA ATT Lys Leu Glu Arg Asp Met Lys Ile Asn Cys Ser Gly Lys Ile Val Ile 190	867
15	GCC AGA TAT GGG AAA GTT TTC AGA GGA AAT ARG GTT AAA ART GCC CAG Ala Arg Tyr Gly Lys Val Phe Arg Gly Asn Lys Val Lys Asn Ala Gln 205	915
20	CTG GCA GGG GCC AAA GGA GTC ATT CTC TAC TCC GAC CCT GCT GAC TAC Leu Ala Gly Ala Lys Gly Val Ile Leu Tyr Ser Asp Pro Ala Asp Tyr 220	963
25	TTT GCT CCT GGG GTG AAG TCC TAT CCA GAT GGT TGG AAT CTT CCT GGA Phe Ala Pro Gly Val Lys Ser Tyr Pro Asp Gly Trp Asn Leu Pro Gly 235	1.011
30	GGT GGT GTC CAG CGT GGA AAT ATC CTA AAT CTG AAT GGT GCA GGA GAC Gly Gly Val Gln Arg Gly Asn Ile Leu Asn Leu Asn Gly Ala Gly Asp 255	1.059
35	CCT CTC ACA CCA GGT TAC CCA GCA AAT GAA TAT GCT TAT AGG CGT GGA Pro Leu Thr Pro Gly Tyr Pro Ala Asn Glu Tyr Ala Tyr Arg Arg Gly 270	1.107
40	ATT GCA GAG GCT GTT GGT CTT CCA AGT ATT CCT GTT CAT CCA ATT GGA Ile Ala Glu Ala Val Gly Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile Gly 285	1.155
45	TAC TAT GAT GCA CAG AAG CTC CTA GAA AAA ATG GGT GGC TCA GCA CCA Tyr Tyr Asp Ala Gln Lys Leu Leu Glu Lys Met Gly Gly Ser Ala Pro 300	1.203
50	CCA GAT AGC AGC TGG AGA GGA AGT CTC AAA GTG CCC TAC AAT GTT GGA Pro Asp Ser Ser Trp Arg Gly Ser Leu Lys Val Pro Tyr Asn Val Gly 315	1.251
55	CCT GGC TTT ACT GGA AAC TTT TCT ACA CAA AAA GTC AAG ATG CAC ATC Pro Gly Phe Thr Gly Asn Phe Ser Thr Gln Lys Val Lys Met His Ile 335	1.299
60	CAC TCT ACC AAT GAA GTG ACA AGA ATT TAC AAT GTG ATA GGT ACT CTC His Ser Thr Asn Glu Val Thr Arg Ile Tyr Asn Val Ile Gly Thr Leu 350	1.347
65	AGA GGA GCA GTG GAA CCA GAC AGA TAT GTC ATT CTG GGA GGT CAC CGG Arg Gly Ala Val Glu Pro Asp Arg Tyr Val Ile Leu Gly Gly His Arg 365	1.395
	GAC TCA TGG GTG TTT GGT GGT ATT GAC CCT CAG AGT GGA GCA GCT GTT Asp Ser Trp Val Phe Gly Gly Ile Asp Pro Gln Ser Gly Ala Ala Val 380	1.443
	GTT CAT GAA ATT GTG AGG AGC TTT GGA ACA CTG AAA AAG GAA GGG TGG Val His Glu Ile Val Arg Ser Phe Gly Thr Leu Lys Lys Glu Gly Trp 395	1.491
	AGA CCT AGA AGA ACA ATT TTG TTT GCA AGC TGG GAT GCA GAA GAA TTT Arg Pro Arg Arg Thr Ile Leu Phe Ala Ser Trp Asp Ala Glu Glu Phe 400	1.539

ES 2 276 390 T3

	415					420					425						
5	GGT	CTT	CTT	GGT	TCT	ACT	GAG	TGG	GCA	GAG	GAG	AAT	TCA	AGA	CTC	CTT	1.587
	Gly	Leu	Leu	Gly	Ser	Thr	Glu	Trp	Ala	Glu	Glu	Asn	Ser	Arg	Leu	Leu	
				430					435					440			
10	CAA	GAG	CGT	GGC	GTG	GCT	TAT	ATT	AAT	GCT	GAC	TCA	TCT	ATA	GAA	GGA	1.635
	Gln	Glu	Arg	Gly	Val	Ala	Tyr	Ile	Asn	Ala	Asp	Ser	Ser	Ile	Glu	Gly	
			445					450					455				
15	AAC	TAC	ACT	CTG	AGA	GTT	GAT	TGT	ACA	CCG	CTG	ATG	TAC	AGC	TTG	GTA	1.683
	Asn	Tyr	Thr	Leu	Arg	Val	Asp	Cys	Thr	Pro	Leu	Met	Tyr	Ser	Leu	Val	
		460				465						470					
20	CAC	AAC	CTA	ACA	AAA	GAG	CTG	AAA	AGC	CCT	GAT	GAA	GGC	TTT	GAA	GGC	1.731
	His	Asn	Leu	Thr	Lys	Glu	Leu	Lys	Ser	Pro	Asp	Glu	Gly	Phe	Glu	Gly	
	475				480						485				490		
25	AAA	TCT	CTT	TAT	GAA	AGT	TGG	ACT	AAA	AAA	AGT	CCT	TCC	CCA	GAG	TTC	1.779
	Lys	Ser	Leu	Tyr	Glu	Ser	Trp	Thr	Lys	Lys	Ser	Pro	Ser	Pro	Glu	Phe	
				495					500					505			
30	AGT	GGC	ATG	CCC	AGG	ATA	AGC	AAA	TTG	GGA	TCT	GGA	AAT	GAT	TTT	GAG	1.827
	Ser	Gly	Met	Pro	Arg	Ile	Ser	Lys	Leu	Gly	Ser	Gly	Asn	Asp	Phe	Glu	
				510				515						520			
35	GTG	TTC	TTC	CAA	CGA	CTT	GGA	ATT	GCT	TCA	GGC	AGA	GCA	CGG	TAT	ACT	1.875
	Val	Phe	Phe	Gln	Arg	Leu	Gly	Ile	Ala	Ser	Gly	Arg	Ala	Arg	Tyr	Thr	
			525				530						535				
40	AAA	AAT	TGG	GAA	ACA	AAC	AAA	TTC	AGC	GGC	TAT	CCA	CTG	TAT	CAC	AGT	1.923
	Lys	Asn	Trp	Glu	Thr	Asn	Lys	Phe	Ser	Gly	Tyr	Pro	Leu	Tyr	His	Ser	
		540				545					550						
45	GTC	TAT	GAA	ACA	TAT	GAG	TTG	GTG	GAA	AAG	TTT	TAT	GAT	CCA	ATG	TTT	1.971
	Val	Tyr	Glu	Thr	Tyr	Glu	Leu	Val	Glu	Lys	Phe	Tyr	Asp	Pro	Met	Phe	
	555				560						565				570		
50	AAA	TAT	CAC	CTC	ACT	GTG	GCC	CAG	GTT	CGA	GGA	GGG	ATG	GTG	TTT	GAG	2.019
	Lys	Tyr	His	Leu	Thr	Val	Ala	Gln	Val	Arg	Gly	Gly	Met	Val	Phe	Glu	
				575					580					585			
55	CTA	GCC	AAT	TCC	ATA	GTG	CTC	CCT	TTT	GAT	TGT	CGA	GAT	TAT	GCT	GTA	2.067
	Leu	Ala	Asn	Ser	Ile	Val	Leu	Pro	Phe	Asp	Cys	Arg	Asp	Tyr	Ala	Val	
			590					595						600			
60	GTT	TTA	AGA	AAG	TAT	GCT	GAC	AAA	ATC	TAC	AGT	ATT	TCT	ATG	AAA	CAT	2.115
	Val	Leu	Arg	Lys	Tyr	Ala	Asp	Lys	Ile	Tyr	Ser	Ile	Ser	Met	Lys	His	
		605				610							615				
65	CCA	CAG	GAA	ATG	AAG	ACA	TAC	AGT	GTA	TCA	TTT	GAT	TCA	CTT	TTT	TCT	2.163
	Pro	Gln	Glu	Met	Lys	Thr	Tyr	Ser	Val	Ser	Phe	Asp	Ser	Leu	Phe	Ser	
		620				625					630						
70	GCA	GTA	AAG	AAT	TTT	ACA	GAA	ATT	GCT	TCC	AAG	TTC	AGT	GAG	AGA	CTC	2.211
	Ala	Val	Lys	Asn	Phe	Thr	Glu	Ile	Ala	Ser	Lys	Phe	Ser	Glu	Arg	Leu	
	635				640					645					650		
75	CAG	GAC	TTT	GAC	AAA	AGC	AAC	CCA	ATA	GTA	TTA	AGA	ATG	ATG	AAT	GAT	2.259
	Gln	Asp	Phe	Asp	Lys	Ser	Asn	Pro	Ile	Val	Leu	Arg	Met	Met	Asn	Asp	
				655						660					665		

ES 2 276 390 T3

	CAA CTC ATG TTT CTG GAA AGA GCA TTT ATT GAT CCA TTA GGG TTA CCA	2.307
	Gln Leu Met Phe Leu Glu Arg Ala Phe Ile Asp Pro Leu Gly Leu Pro	
	670 675 680	
5	GAC AGG CCT TTT TAT AGG CRT GTC ATC TAT GCT CCA AGC AGC CAC AAC	2.355
	Asp Arg Pro Phe Tyr Arg His Val Ile Tyr Ala Pro Ser Ser His Asn	
	685 690 695	
10	AAG TAT GCA GGG GAG TCA TTC CCA GGA ATT TAT GAT GCT CTG TTT GAT	2.403
	Lys Tyr Ala Gly Glu Ser Phe Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu Phe Asp	
	700 705 710	
	ATT GAA AGC AAA GTG GAC CCT TCC AAG GCC TGG GGA GAA GTG AAG AGA	2.451
	Ile Glu Ser Lys Val Asp Pro Ser Lys Ala Trp Gly Glu Val Lys Arg	
	715 720 725 730	
15	CAG ATT TAT GTT GCA GCC TTC ACA GTG CAG GCA GCT GCA GAG ACT TTG	2.499
	Gln Ile Tyr Val Ala Ala Phe Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu Thr Leu	
	735 740 745	
20	AGT GAA GTA GCC TAAGAGGATT CTTAGAGAA TCCGTATTGA ATTTGTGTGG	2.551
	Ser Glu Val Ala	
	750	
	TATGTCACTC AGAAGAATC GTAATGGGTA TATIGATAAA TTTTAAAATT GGTATATTG	2.611
25	AAATAAAGTT GAATATTATA TATAAAAAA AAAAAAAA AA	2.653

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 750 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:2:

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

ES 2 276 390 T3

	115		120		125														
5	Ser	Ile	Ile	Asn	Glu	Asp	Gly	Asn	Glu	Ile	Phe	Asn	Thr	Ser	Leu	Phe			
	130						135					140							
	Glu	Pro	Pro	Pro	Pro	Gly	Tyr	Glu	Asn	Val	Ser	Asp	Ile	Val	Pro	Pro			
	145					150					155					160			
10	Phe	Ser	Ala	Phe	Ser	Pro	Gln	Gly	Met	Pro	Glu	Gly	Asp	Leu	Val	Tyr			
					165					170					175				
	Val	Asn	Tyr	Ala	Arg	Thr	Glu	Asp	Phe	Phe	Lys	Leu	Glu	Arg	Asp	Met			
				180					185					190					
15	Lys	Ile	Asn	Cys	Ser	Gly	Lys	Ile	Val	Ile	Ala	Arg	Tyr	Gly	Lys	Val			
			195					200					205						
	Phe	Arg	Gly	Asn	Lys	Val	Lys	Asn	Ala	Gln	Leu	Ala	Gly	Ala	Lys	Gly			
	210						215						220						
20	Val	Ile	Leu	Tyr	Ser	Asp	Pro	Ala	Asp	Tyr	Phe	Ala	Pro	Gly	Val	Lys			
	225					230					235					240			
	Ser	Tyr	Pro	Asp	Gly	Trp	Asn	Leu	Pro	Gly	Gly	Gly	Val	Gln	Arg	Gly			
					245					250					255				
25	Asn	Ile	Leu	Asn	Leu	Asn	Gly	Ala	Gly	Asp	Pro	Leu	Thr	Pro	Gly	Tyr			
				260					265					270					
	Pro	Ala	Asn	Glu	Tyr	Ala	Tyr	Arg	Arg	Gly	Ile	Ala	Glu	Ala	Val	Gly			
			275					280					285						
30	Leu	Pro	Ser	Ile	Pro	Val	His	Pro	Ile	Gly	Tyr	Tyr	Asp	Ala	Gln	Lys			
	290						295					300							
	Leu	Leu	Glu	Lys	Met	Gly	Gly	Ser	Ala	Pro	Pro	Asp	Ser	Ser	Trp	Arg			
	305					310					315					320			
35	Gly	Ser	Leu	Lys	Val	Pro	Tyr	Asn	Val	Gly	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Asn			
					325					330					335				
	Phe	Ser	Thr	Gln	Lys	Val	Lys	Met	His	Ile	His	Ser	Thr	Asn	Glu	Val			
				340					345					350					
40	Thr	Arg	Ile	Tyr	Asn	Val	Ile	Gly	Thr	Leu	Arg	Gly	Ala	Val	Glu	Pro			
			355					360					365						
	Asp	Arg	Tyr	Val	Ile	Leu	Gly	Gly	His	Arg	Asp	Ser	Trp	Val	Phe	Gly			
	370						375					380							
45	Gly	Ile	Asp	Pro	Gln	Ser	Gly	Ala	Ala	Val	Val	His	Glu	Ile	Val	Arg			
	385					390					395					400			
	Ser	Phe	Gly	Thr	Leu	Lys	Lys	Glu	Gly	Trp	Arg	Pro	Arg	Arg	Thr	Ile			
					405					410					415				
50	Leu	Phe	Ala	Ser	Trp	Asp	Ala	Glu	Glu	Phe	Gly	Leu	Leu	Gly	Ser	Thr			
				420					425					430					
	Glu	Trp	Ala	Glu	Glu	Asn	Ser	Arg	Leu	Leu	Gln	Glu	Arg	Gly	Val	Ala			
			435					440					445						

ES 2 276 390 T3

Tyr Ile Asn Ala Asp Ser Ser Ile Glu Gly Asn Tyr Thr Leu Arg Val  
 450 455 460  
 Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr Ser Leu Val His Asn Leu Thr Lys Glu  
 465 470 475 480  
 Leu Lys Ser Pro Asp Glu Gly Phe Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Glu Ser  
 485 490 495  
 Trp Thr Lys Lys Ser Pro Ser Pro Glu Phe Ser Gly Met Pro Arg Ile  
 500 505 510  
 Ser Lys Leu Gly Ser Gly Asn Asp Phe Glu Val Phe Phe Gln Arg Leu  
 515 520 525  
 Gly Ile Ala Ser Gly Arg Ala Arg Tyr Thr Lys Asn Trp Glu Thr Asn  
 530 535 540  
 Lys Phe Ser Gly Tyr Pro Leu Tyr His Ser Val Tyr Glu Thr Tyr Glu  
 545 550 555 560  
 Leu Val Glu Lys Phe Tyr Asp Pro Met Phe Lys Tyr His Leu Thr Val  
 565 570 575  
 Ala Gln Val Arg Gly Gly Met Val Phe Glu Leu Ala Asn Ser Ile Val  
 580 585 590  
 Leu Pro Phe Asp Cys Arg Asp Tyr Ala Val Val Leu Arg Lys Tyr Ala  
 595 600 605  
 Asp Lys Ile Tyr Ser Ile Ser Met Lys His Pro Gln Glu Met Lys Thr  
 610 615 620  
 Tyr Ser Val Ser Phe Asp Ser Leu Phe Ser Ala Val Lys Asn Phe Thr  
 625 630 635 640  
 Glu Ile Ala Ser Lys Phe Ser Glu Arg Leu Gln Asp Phe Asp Lys Ser  
 645 650 655  
 Asn Pro Ile Val Leu Arg Met Met Asn Asp Gln Leu Met Phe Leu Glu  
 660 665 670  
 Arg Ala Phe Ile Asp Pro Leu Gly Leu Pro Asp Arg Pro Phe Tyr Arg  
 675 680 685  
 His Val Ile Tyr Ala Pro Ser Ser His Asn Lys Tyr Ala Gly Glu Ser  
 690 695 700  
 Phe Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val Asp  
 705 710 715 720  
 Pro Ser Lys Ala Trp Gly Glu Val Lys Arg Gln Ile Tyr Val Ala Ala  
 725 730 735  
 Phe Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ser Glu Val Ala  
 740 745 750

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 8 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

## ES 2 276 390 T3

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(F) TIPO DE TEJIDO: Carcinoma

5 (vii) FUENTE PRINCIPAL:

(B) CLON: Antígeno de Membrana Específico de la Próstata

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:3:

10 Ser Leu Tyr Glu Ser Xaa Thr Lys  
1 5

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:4:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

20 (C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

25 (iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

30 (A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(F) TIPO DE TEJIDO: Carcinoma

(vii) FUENTE PRINCIPAL:

35 (B) CLON: Antígeno de Membrana Específico de la Próstata

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:4:

40 Ser Tyr Pro Asp Gly Xaa Asn Leu Pro Gly Gly Gly Val Gln Arg  
1 5 10 15

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:5:

45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 7 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

50 (C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

55 (iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

60 (A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(F) TIPO DE TEJIDO: Carcinoma

(vii) FUENTE PRINCIPAL:

(B) CLON: Antígeno de Membrana Específico de la Próstata

65 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:5:

Phe Tyr Asp Pro Met Phe Lys  
1 5

## ES 2 276 390 T3

### (2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:6:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 9 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(C) TIPO DE CADENA: doble  
10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(iii) HIPOTÉTICO: NO

15 (iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: *Homo sapiens*  
20 (F) TIPO DE TEJIDO: Carcinoma

(vii) FUENTE PRINCIPAL:

(B) CLON: Antígeno de Membrana Específico de la Próstata

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:6:

Ile Tyr Asn Val Ile Gly Thr Leu Lys  
1 5

### 30 (2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:7:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 22 aminoácidos  
35 (B) TIPO: aminoácido  
(C) TIPO DE CADENA: doble  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

45 (vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: *Homo sapiens*  
(F) TIPO DE TEJIDO: Carcinoma

50 (vii) FUENTE PRINCIPAL:

(B) CLON: Antígeno de Membrana Específico de la Próstata

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:7:

55 Phe Leu Tyr Xaa Xaa Thr Gln Ile Pro His Leu Ala Gly Thr Glu Gln  
1 5 10 15  
Asn Phe Gln Leu Ala Lys  
20

### 60 (2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:8:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 65 (A) LONGITUD: 17 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(C) TIPO DE CADENA: doble

## ES 2 276 390 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

5 (iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

10 (A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(F) TIPO DE TEJIDO: Carcinoma

(vii) FUENTE PRINCIPAL:

15 (B) CLON: Antígeno de Membrana Específico de la Próstata

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:8:

20 Gly Val Ile Leu Tyr Ser Asp Pro Ala Asp Tyr Phe Ala Pro Asp Val  
1 5 10 15  
Lys

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:9:

25

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

30

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

35

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

40

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(F) TIPO DE TEJIDO: Carcinoma

(vii) FUENTE PRINCIPAL:

45

(B) CLON: Antígeno de Membrana Específico de la Próstata

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:9:

50 Pro Val Ile Leu Tyr Ser Asp Pro Ala Asp Tyr Phe Ala Pro Gly Val  
1 5 10 15  
Lys

55 (2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 aminoácidos

60

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

65

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

## ES 2 276 390 T3

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(F) TIPO DE TEJIDO: Carcinoma

(vii) FUENTE PRINCIPAL:

(B) CLON: Antígeno de Membrana Específico de la Próstata

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:10:

Ala Phe Ile Asp Pro Leu Gly Leu Pro Asp Arg Pro Phe Tyr Arg  
1 5 10 15

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 19 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(F) TIPO DE TEJIDO: Carcinoma

(vii) FUENTE PRINCIPAL:

(B) CLON: Antígeno de Membrana Específico de la Próstata

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:11:

Tyr Ala Gly Glu Ser Phe Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Ile  
1 5 10 15  
Glu Ser Lys

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 22 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(F) TIPO DE TEJIDO: Carcinoma

(vii) FUENTE PRINCIPAL:

## ES 2 276 390 T3

(B) CLON: Antígeno de Membrana Específico de la Próstata

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:12:

5 Thr Ile Leu Phe Ala Ser Trp Asp Ala Glu Glu Phe Gly Xaa Xaa Glu  
1 5 10 15  
Ser Thr Glu Glu Ala Glu  
20

10 (2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

25 (vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(F) TIPO DE TEJIDO: Carcinoma

30 (vii) FUENTE PRINCIPAL:

(B) CLON: Antígeno de Membrana Específico de la Próstata

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:13:

35 TTYTAYGAYC CNATGTT

17

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:14:

40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

45 (C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

50 (iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

55 (A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(F) TIPO DE TEJIDO: Carcinoma

(vii) FUENTE PRINCIPAL:

60 (B) CLON: Antígeno de Membrana Específico de la Próstata

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:14:

65 AACATNGGRT CRTARAA

17

## ES 2 276 390 T3

### (2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:15:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(F) TIPO DE TEJIDO: Carcinoma

(vii) FUENTE PRINCIPAL:

(B) CLON: Antígeno de Membrana Específico de la Próstata

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:15:

ATHTAYAAYG TNATHGG

17

### (2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:16:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(F) TIPO DE TEJIDO: Carcinoma

(vii) FUENTE PRINCIPAL:

(B) CLON: Antígeno de Membrana Específico de la Próstata

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:16:

CCDATNACRT TRTADAT

17

### (2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:17:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

## ES 2 276 390 T3

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(F) TIPO DE TEJIDO: Carcinoma

(vii) FUENTE PRINCIPAL:

(B) CLON: Antígeno de Membrana Específico de la Próstata

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:17:

CCNGCNGAYT AYT TYGC

17

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(F) TIPO DE TEJIDO: Carcinoma

(vii) FUENTE PRINCIPAL:

(B) CLON: Antígeno de Membrana Específico de la Próstata

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:18:

GCRAARTART CNGCNGG

17

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(F) TIPO DE TEJIDO: Carcinoma

(vii) FUENTE PRINCIPAL:

(B) CLON: Antígeno de Membrana Específico de la Próstata

## ES 2 276 390 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:19:

ACNGARCARA AYTTCARCT

20

5

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

20

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(F) TIPO DE TEJIDO: Carcinoma

25

(vii) FUENTE PRINCIPAL:

(B) CLON: Antígeno de Membrana Específico de la Próstata

30

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:20:

AGYTGRAART TYTGYTCNGT

20

35

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

40

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

45

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

50

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(F) TIPO DE TEJIDO: Carcinoma

55

(vii) FUENTE PRINCIPAL:

(B) CLON: Antígeno de Membrana Específico de la Próstata

60

GARCARAAYT TYCARCT

17

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

65

(A) LONGITUD: 17 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

## ES 2 276 390 T3

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(F) TIPO DE TEJIDO: Carcinoma

(vii) FUENTE PRINCIPAL:

(B) CLON: Antígeno de Membrana Específico de la Próstata

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:22:

AGYTGRAART TYTGYTC

17

### (2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(F) TIPO DE TEJIDO: Carcinoma

(vii) FUENTE PRINCIPAL:

(B) CLON: Antígeno de Membrana Específico de la Próstata

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:23:

TGGGAYGCNG ARGARTTYGG

20

### (2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:24:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

## ES 2 276 390 T3

(F) TIPO DE TEJIDO: Carcinoma

(vii) FUENTE PRINCIPAL:

(B) CLON: Antígeno de Membrana Específico de la Próstata

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:24:

CCRAAYTCYT CNGCRTCCCA

20

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:25:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(F) TIPO DE TEJIDO: Carcinoma

(vii) FUENTE PRINCIPAL:

(B) CLON: Antígeno de Membrana Específico de la Próstata

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:25:

TGGGAYGCNG ARGARTT

17

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:26:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(F) TIPO DE TEJIDO: Carcinoma

(vii) FUENTE PRINCIPAL:

(B) CLON: Antígeno de Membrana Específico de la Próstata

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:26:

AAYTCYTCNG CRTCCCA

17

## ES 2 276 390 T3

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:27:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 780 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:27:

```

TACACTTATC CCATTCCGGAC ATGCCACACT TGGAACTGGA GACCCTTACA CCCCAGGCTT      60
CCCTTCGTTT AACCACACCC ANNNGTTTCC ACCAGTTGAA TCTTCAGGAC TACCCACAT      120
TGCTGTTTCA ACCATCTCTA GCAGTGCAGC AGCCAGGCTG TTCAGCAAAA TGGATGGAGA      180
CACATGCTCT GANAGNNNGTT GGAAAGGTGC GATCCANNNT TCCTGTAAGG TNNGACNNA      240
CAAAGCAGGA GANNNGCCA GANTAATGGT GAAACTGAT GTGAACAATT CCATGAAAGA      300
CAGGAAGATT CTGAACATCT TCGGTGCTAT CCAGGGATT GAAGAACCCTG ATCGGTATGT      360
TGTGATTGGA GCCCAGAGAG ACTCCTGGGG CCCAGGAGTG GCTAAAAGCTG GCACTGGAAC      420
TGCTATATTT TTGGAACCTG CCCGTGTGAT CTCAGACATA GTGAAAAACG AGGGCTACAA      480
ACCGAGGCGA AGCATCATCT TTGCTAGCTG GAGTGCAGGA GACTACGGAG CTGTGGGTGC      540
TACTGAATGG CTGGAGGGGT ACTCTGCCAT GCTGCATGCC AAAGCTTTCA CTTACATCAN      600
NGCTTGGATG CTCCAGTCTT GGGAGCAAGC CATGTCAAGA TTTCTGCCAG CCCCTTGCTG      660
TATATGCTGC TGGGGAGTAT TATGAAGGGG GTGAAGAATC CAGCAGCAGT CTCAGAGAGC      720

NNNNCTCTAT AACAGACTTG GCCCAGACTG GGTAAAAGCA GTTGTTCCTC TTGGCCTGGA      780
    
```

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:28:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 660 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:28:

## ES 2 276 390 T3

	<b>TGCAGAAAG CTATTCAAAA ACATGGAAGG AACTGTCTCT CCEAGTTGGA ATATAGATTC</b>	<b>60</b>
	<b>CTCATGTAAG CTGGAACTTT CACAGAATCA AAATGTGAAG CTCACTGTGA ACAATGTACT</b>	<b>120</b>
5	<b>GAAAGAAACA AGAATACTTA ACATCTTTGG CGTTATTAAA GGCTATGAGG AACCCAGACCG</b>	<b>180</b>
	<b>CTACATTGTA GTAGGAGCCC AGAGAGACGC TTGGGGCCCT GGTNGTTGCG AAGTCCAGTG</b>	<b>240</b>
	<b>TGGGAACAGG TCTTNCCTGT GAAACTTGCC CAAGTATTCT CAGATATGAT TTCAAAGAT</b>	<b>300</b>
10	<b>GGATTAGAC CCAGCAGGAG TATTATCTTT GCCAGCTGGA CTGCAGGAGA CTATGGAGCT</b>	<b>360</b>
	<b>GTTGGTCCGA CTGAGTGGCT GGAGGGGTAC CTTTCATCTT TGCATCTAAA GKNNGCTTTC</b>	<b>420</b>
	<b>ACTTACATTA ATNCTGGATA AAGTGTCTCT GGGTACTAGC AACTTCAAGG TTCTGCCAG</b>	<b>480</b>
15	<b>CCCCCTATTA TATACACTTA TGGGAAGAT AATGCAGGAN NCGTAAAGCA TCCGANNNNN</b>	<b>540</b>
	<b>NNNTTGTAGG AAATATCTA TATCGAAACA GTAATTGGAT TAGCAAAATT GAGAACTTT</b>	<b>600</b>
20	<b>CCTTGGACAA TGCTGCATTC CCTTTCTCTG CATATTCAGG AATCCCAGCA GTTCTTTTCT</b>	<b>660</b>

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:29:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 540 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:29:

	<b>TATGGAAGGA GACTGTCCCT CTGACTGGAA AACAGACTCT ACATGTAGGA TGGTAACTC</b>	<b>60</b>
	<b>AGAAAGCAAG AATGTGAGC TCACCTGTGAG CAATGTGCTG AAGAGATAA AAATCTTAA</b>	<b>120</b>
	<b>CATCTTTGGA GTTATTAAAG GCTTTGTAGA ACCAGATCAC TATGTTGTAG TTGGGGCCCA</b>	<b>180</b>
45	<b>GAGAGATGCA TGGGGCCCTG GAGCTGCAAA ATCNCGGTGT AGGCACAGCT CTCCTATTGA</b>	<b>240</b>
	<b>AACTTGCCCA GATGTTCTCA GATATGGTCT TAAAAGATGG GTTTCAGCCC AGCAGAAGCA</b>	<b>300</b>
	<b>TTATCTTTGC CAGTTGGAGT GCTGGAGACT TTGATCGGT TGGTGCCACT GAATGGCTAG</b>	<b>360</b>
50	<b>AGGGATACCT TTCGTNCCT GCATTTAAAG GCTTTCACCT ATATTATCT GGATAAGCG</b>	<b>420</b>
	<b>GTTCTTGGTA CCAGCAACTT CAGGTTTCT GCCAGCCAC TGTGTATAC GCTTATTGAG</b>	<b>480</b>
55	<b>AAAACAATGC AAAATGTGAA GCATCCGGT ACTGGGCAAT TTCTATATCA GGACAGCAAC</b>	<b>540</b>

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:30:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 27 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido



## ES 2 276 390 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:32:

CTCTTCGGCA TCCCAGCTTG CAAACAAAAT TGTTCT

36

5

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:33:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

20

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(F) TIPO DE TEJIDO: Carcinoma

25

(vii) FUENTE PRINCIPAL:

(B) CLON: Antígeno de Membrana Específico de la Próstata

30

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:33:

AGAACAATTT TGTTTGCAAG CTGGGATGCC AAGGAG

36

35

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:34:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

40

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

45

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

50

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(G) TIPO DE CÉLULA: Carcinoma

55

(vii) FUENTE PRINCIPAL:

(B) CLON: Antígeno de Membrana Específico de la Próstata

60

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:34:

Arg Thr Ile Leu Phe Ala Ser Trp Asp Ala Glu Glu  
1 5 10

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:35:

65

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

## ES 2 276 390 T3

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(G) TIPO DE CÉLULA: Carcinoma

(vii) FUENTE PRINCIPAL:

(B) CLON: Antígeno de Membrana Específico de la Próstata

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:35:

Asp Glu Leu Lys Ala Glu  
1 5

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:36:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(G) TIPO DE CÉLULA: Carcinoma

(vii) FUENTE PRINCIPAL:

(B) CLON: Antígeno de Membrana Específico de la Próstata

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:36:

Asn Glu Asp Gly Asn Glu  
1 5

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:37:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

## ES 2 276 390 T3

(A) ORGANISMO: *Homo Sapien*

(G) TIPO DE CÉLULA: Carcinoma

5 (vii) FUENTE PRINCIPAL:

(B) CLON: Antígeno de Membrana Específico de la Próstata

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:37:

10 Lys Ser Pro Asp Glu Gly  
1 5

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO:38:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

20 (C) TIPO DE CADENA: doble

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

25 (iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

30 (A) ORGANISMO: *Homo Sapien*

(G) TIPO DE CÉLULA: Carcinoma

(vii) FUENTE PRINCIPAL:

35 (B) CLON: Antígeno de Membrana Específico de la Próstata

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:38:

40 Ala Gly Ala Leu Val Leu Ala Gly Gly Phe Phe Leu Leu Gly Phe Leu  
1 5 10 15  
Phe

45

50

55

60

65