

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 394 093**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2000** **E 06011686 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **20.12.2006** **EP 1734134**

54 Título: **Método para el cribado de compuestos que inhiben la expresión de UC41 en células de próstata**

30 Prioridad:

09.02.1999 US 247188

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.01.2013

73 Titular/es:

**LABORATORY CORPORATION OF AMERICA
HOLDINGS, INC. (100.0%)
358 South Main Street
Burlington, NC 27215-5837, US**

72 Inventor/es:

**GANG, A.N. y
VELTRI, ROBERT**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 394 093 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

Método para el cribado de compuestos que inhiben la expresión de UC41 en células de próstata

1.1 Campo de la invención

5 La presente divulgación se refiere en general a nuevas secuencias de ácido nucleico, polipéptidos codificados por las nuevas secuencias de ácido nucleico y los anticuerpos específicos para estos polipéptidos, útiles como sondas o cebadores para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer de próstata y métodos relacionados. Más concretamente, la presente divulgación se refiere a sondas, cebadores y métodos útiles para el diagnóstico, la identificación y el control de la progresión del cáncer de próstata a través de mediciones de productos genéticos. La
10 la presente divulgación se refiere también a un nuevo gen específico de la próstata y a los métodos de tratamiento para el cáncer de próstata, basándose en las secuencias de polipéptidos y ácido nucleico divulgadas.

1.2 Descripción del campo relacionado

15 La detección genética de estados patológicos en el ser humano es un campo que está avanzando rápidamente (Taparowsky *et al*, 1982; Slamon *et al*, 1989; Sidransky *et al*, 1992; Miki *et al.*, 1994; Dong *et al*, 1995; Morahan *et al.*, 1996; Lifton, 1996; Barinaga, 1996). No obstante, este enfoque plantea varios problemas. Una serie de lesiones genéticas conocidas simplemente predispone al desarrollo de estados patológicos específicos. Los individuos que presentan la lesión genética pueden no desarrollar el estado patológico, mientras que otros individuos pueden desarrollarlo sin presentar una lesión genética concreta. En los cánceres humanos, los defectos genéticos pueden presentarse en un gran número de genes supresores tumorales y protooncogenes conocidos.

20 La detección genética del cáncer tiene una larga historia. Una de las primeras lesiones genéticas que se ha demostrado que predispone al cáncer fueron las mutaciones puntuales de transformación de los oncogenes ras (Taparowsky *et al*, 1982). Las mutaciones puntuales de transformación del ras se pueden detectar en las deposiciones de individuos con tumores colorrectales malignos y benignos (Sidransky *et al.*, 1992). No obstante, solamente el 50 % de estos tumores contenía una mutación del ras (Sidransky *et al*, 1992). Resultados similares se han obtenido con la amplificación de HER-2/neu en el cáncer de mama y de ovario (Slamon *et al.*, 1989), la delección y mutación de p53 en el cáncer de vejiga (Sidransky *et al.*, 1991), la delección de DCC en el cáncer colorrectal (Fearon *et al.*, 1990) y la mutación de BRCA1 en el cáncer de mama y ovario (Miki *et al.*, 1994).

Ninguna de estas lesiones genéticas es capaz de predecir el cáncer en la mayoría de los individuos y casi siempre es necesario un muestreo directo de un tumor sospechado, lo que dificulta la detección.

30 Además, ninguno de los marcadores anteriormente descritos es capaz de distinguir entre las formas metastásicas y no metastásicas del cáncer. Para el tratamiento efectivo de los pacientes con cáncer, resulta fundamental identificar a los individuos cuyos tumores ya han experimentado metástasis o es probable que experimenten metástasis. Dado que el cáncer metastásico mata a 560.000 personas en los Estados Unidos cada año (página web de la ACS), la identificación de marcadores para el cáncer de próstata metastásico supondría un importante avance.

35 En el caso del cáncer de próstata, su detección y diagnóstico plantea un particular problema. El carcinoma de próstata (PCA) es el cáncer diagnosticado más frecuentemente entre los hombres en los Estados Unidos (Veltri *et al.*, 1996). El cáncer de próstata fue diagnosticado en unos 189.000 hombres en 1998 y unos 40.000 hombres sucumbieron a la malignidad (Landis *et al.*, 1998). A pesar de que son relativamente pocos los tumores de próstata que progresan hasta alcanzar una importancia clínica durante la vida del paciente, aquellos de naturaleza progresiva es probable que hayan experimentado metástasis para el momento de su detección. Los índices de supervivencia de los individuos con cáncer de próstata metastásicos son bastante bajos. Entre estos extremos se encuentran los
40 pacientes con tumores de próstata que experimentarán metástasis, pero todavía no lo han hecho, para los que la extirpación quirúrgica de la próstata es curativa. Resulta fundamental determinar a qué grupo pertenece un paciente para seleccionar el tratamiento óptimo y para la supervivencia del paciente.

45 La aprobación por parte de la FDA de la prueba del antígeno prostático específico (PSA) en suero en 1984 cambió la forma de tratamiento de la enfermedad prostática (Allhoff *et al.*, 1989; Cooner *et al* 1990; Jacobson *et al*, 1995; Orozco *et al*, 1998). El PSA se utiliza generalmente como biomarcador sérico para detectar y controlar la respuesta terapéutica en pacientes con cáncer de próstata (Badalament *et al*, 1996; O'Dowd *et al*, 1997). Diversas modificaciones en los ensayos del PSA (Partin y Oesterling, 1994; Babian *et al*, 1996; Zlotta *et al*, 1997) han permitido un diagnóstico más temprano y la mejora del tratamiento.

50 A pesar de que el PSA se ha empleado ampliamente como marcador clínico del cáncer de próstata desde 1988 (Partin y Oesterling, 1994), los programas de detección que utilizan PSA solamente o en combinación con el examen

rectal digital (DRE) no han conseguido mejorar el índice de supervivencia de los hombres con cáncer de próstata (Partin y Oesterling, 1994). A pesar de que el PSA es específico del tejido prostático, es producido por el epitelio prostático normal y benigno así como por el maligno, lo que resulta en un elevado índice de falsos positivos en la detección del cáncer de próstata (Partin y Oesterling, 1994).

5 A pesar de resultar un indicador efectivo del cáncer de próstata cuando los niveles en suero son relativamente elevados, los niveles en suero de PSA son unos indicadores más ambiguos cuando solamente son ligeramente elevados, por ejemplo cuando se encuentran entre 2 y 10 ng/ml. Cuando los niveles son ligeramente elevados, el PSA en suero puede haberse originado por estados patológicos no cancerosos, como la BPH (hiperplasia prostática benigna), prostatitis o un traumatismo físico (McCormack et al, 1995). A pesar de que la aplicación de la
10 concentración de corte mínima de 2,0 ng/ml de PSA en suero para la detección del cáncer ha incrementado el índice de diagnóstico del cáncer de próstata, en especial en los hombres más jóvenes con tumores en fase temprana no palpable (estadio TIC) (Soh et al, 1997; Carter y Coffey, 1997; Harris et al, 1997; Orozco et al, 1998), la especificidad del ensayo de PSA para la detección del cáncer de próstata con bajos niveles de PSA en suero continúa representando un problema.

15 Varios investigadores han intentado mejorar la especificidad de la detección serológica del cáncer de próstata, examinando varios otros biomarcadores además de la concentración de PSA en suero (Ralph y Veltri, 1997). Uno de estos biomarcadores más investigados es el ratio de PSA libre frente a PSA total (f/t PSA) en la sangre de un paciente. La mayoría del PSA en suero se encuentra en forma molecular que se une a otras proteínas como la α 1-antiquimiotripsina (ACT) o la α 2-macroglobulina (Christensson et al, 1993; Stenman et al, 1991; Lilja et al, 1991).
20 El PSA libre no se une a otras proteínas. En general, el índice de PSA libre frente al total (f/tPSA) es significativamente superior en pacientes con BPH en comparación con los que padecen un cáncer de próstata confinado al órgano (Marley et al., 1996; Oesterling et al, 1995; Pettersson et al, 1995). Cuando se determina una concentración de corte apropiada para el ensayo de f/tPSA, el ensayo de f/tPSA puede ayudar a distinguir a los pacientes con BPH de los que padecen cáncer de próstata, en los que los niveles de PSA en suero son sólo ligeramente elevados (Marley et al., 1996; Partin y Oesterling, 1996). Lamentablemente, a pesar de que el f/tPSA
25 puede mejorar la detección del cáncer de próstata, la información sobre el ratio f/tPSA es insuficiente para mejorar la sensibilidad y especificidad de la detección serológica del cáncer de próstata hasta unos niveles deseables.

Otros marcadores que se han empleado para la detección del cáncer de próstata incluyen la fosfatasa ácida prostática (PAP) y la proteína secretada por la próstata (PSP). La PAP es secretada por las células prostáticas bajo control hormonal (Brawn et al, 1996). Presenta una menor especificidad y sensibilidad que la PSA. Como resultado, ahora se utiliza mucho menos, aunque la PAP puede tener, no obstante, algunas aplicaciones para controlar a los
30 pacientes con metástasis en los que han fracasado los tratamientos primarios. Por lo general, la PSP es un biomarcador más sensible que la PAP, aunque no tanto como el PSA (Huang et al, 1993). Al igual que en el caso del PSA, a menudo los niveles de PSP son elevados tanto en los pacientes con BPH, como en los que padecen cáncer de próstata.
35

Otro marcador sérico asociado con la enfermedad prostática es el antígeno prostático específico de membrana (PSMA) (Horoszewicz et al., 1987; Carter y Coffey, 1996; Murphy et al, 1996). El PSMA es una proteína de la membrana celular de tipo II y ha sido identificada como hidrolasa de ácido fólico (FAH) (Carter y Coffey, 1996). Los anticuerpos contra el PSMA reaccionan tanto con el tejido prostático normal como con el tejido prostático canceroso
40 (Horoszewicz et al., 1987). Murphy et al. (1995) emplearon un ensayo ELISA para detectar el PSMA sérico en el cáncer de próstata avanzado. Como ensayo sérico, los niveles de PSMA son un indicador relativamente pobre del cáncer de próstata. No obstante, el PSMA puede resultar útil en determinadas circunstancias. El PSMA se expresa en los lechos capilares del tumor de próstata metastásico (Silver et al., 1997) y se han documentado unos niveles más elevados en la sangre de los pacientes con cáncer metastásico (Murphy et al., 1996). El RNA mensajero (mRNA) del PSMA se regula a la baja entre 8 y 10 veces en la línea celular LNCaP del cáncer de próstata, tras la exposición a 5- α -dihidrotestosterona (DHT) (Israeli et al., 1994).
45

Dos potenciales biomarcadores relativamente nuevos para el cáncer de próstata son la calicreína humana 2 (HK2) (Piironen et al, 1996) y la transglutaminasa prostática específica (pTGase) (Dubbink et al, 1996). La HK2 es un miembro de la familia de la calicreína que es secretada por la glándula prostática (Piironen et al., 1996). La transglutaminasa prostática específica es una enzima dependiente de calcio expresada en las células prostáticas, que cataliza el enlace cruzado postraslacional de las proteínas (Dubbink et al., 1996). En teoría, las concentraciones séricas de HK2 o pTGase pueden ser útiles para la detección o el diagnóstico del cáncer de próstata, aunque la utilidad de estos marcadores todavía está siendo evaluada.
50

La interleucina 8 (IL-8) también se ha documentado como marcador para el cáncer de próstata. (Veltri et al, 1999). Se ha documentado que las concentraciones de IL-8 en suero están correlacionadas con el aumento del estadio del
55 cáncer de próstata y que son capaces de diferenciar la BPH de los tumores de próstata malignos. (Id.) La

aplicabilidad a gran escala de este marcador para la detección y el diagnóstico del cáncer de próstata todavía se está investigando.

Además de estos marcadores proteicos para el cáncer de próstata, se han documentado varios cambios genéticos asociados con este tipo de cáncer, entre los que se incluyen: pérdida alélica (Bova, et al., 1993; Macoska et al., 1994; Carter et al., 1990); hipermetilación del ADN (Isaacs et al., 1994); mutaciones puntuales o deleciones del retinoblastoma (Rb), de los genes p53 y KAI1 (Bookstein et al., 1990a; Bookstein et al., 1990b; Isaacs et al., 1991; Dong et al., 1995); y aneuploidia y aneusomía de cromosomas detectadas por fluorescencia en la hibridación in situ (FISH) (Macoska et al., 1994; Visakorpi et al., 1994; Takahashi et al., 1994; Alcaraz et al., 1994). No se ha documentado que ninguno de ellos presente una sensibilidad y especificidad suficientes como para resultar útiles como herramientas de detección general para el cáncer de próstata asintomático.

Un descubrimiento reciente ha sido que la expresión diferenciada tanto de la forma de longitud completa como de la forma truncada del receptor del oncogen HER2/neu está correlacionada con el cáncer de próstata. (An et al., 1998). El análisis mediante RT-PCR™ ha indicado que la sobreexpresión del gen HER2/rceu está asociada con la progresión del cáncer de próstata. (Id.)

En la práctica clínica actual, el ensayo del PSA sérico y el examen rectal digital (DRE) se emplea para indicar qué pacientes deberían someterse a una biopsia prostática (Lithrup et al., 1994; Orozco et al., 1998). El examen histológico del tejido biopsiado se emplea para realizar el diagnóstico del cáncer de próstata. Basándose en los 189.500 casos de cáncer de próstata diagnosticados en 1998 (Landis, 1998) y en un índice de detección del cáncer conocido cercano al 35% (Parker et al., 1996), se calcula que en 1998 se realizaron más de 500.000 de biopsias de próstata en los Estados Unidos (Orozco et al., 1998; Veltri et al., 1998). Claramente, se obtendría un beneficio mucho mayor de una prueba serológica que fuese lo suficientemente sensible como para detectar los tumores prostáticos pequeños y en un estadio temprano, que ofreciese también la especificidad suficiente como para excluir una parte mayor de pacientes con condiciones clínicamente insignificantes o no cancerosas.

Siguen existiendo deficiencias en el campo hasta la fecha con respecto a la identificación de los genes asociados con la progresión del cáncer de próstata y el desarrollo de métodos diagnósticos para controlar la progresión de la enfermedad. Del mismo modo, la identificación de genes que se expresan de forma diferenciada en el cáncer de próstata tendría una importancia considerable para el desarrollo de un método rápido y económico para el diagnóstico del cáncer. A pesar de que se han clonado algunos genes específicos de la próstata (PSA, PSMA, HK2, pTGase, etc.), normalmente estos no se regulan al alza en el cáncer de próstata. La identificación de un nuevo gen específico de la próstata, que se expresa de forma diferenciada en el cáncer de próstata en comparación con el tejido prostático no maligno representaría un importante e imprevisto avance para el diagnóstico, el pronóstico y tratamiento del cáncer de próstata.

2. RESUMEN DE LA INVENCION

La presente divulgación aborda las deficiencias existentes en el campo hasta la fecha, identificando un nuevo gen específico de la próstata que se expresa de forma diferenciada en el cáncer de próstata humano en comparación con la próstata humana normal o la hiperplasia prostática benigna (BPH). Las especies de mRNA codificado y las correspondientes especies de proteína codificada tienen utilidad, por ejemplo, como marcadores del cáncer de próstata. Los anticuerpos contra las especies de proteína codificada, así como las estructuras antisentido específicas para las especies de mRNA, tienen utilidad para los métodos de tratamiento terapéutico del cáncer de próstata. Por otra parte, se puede utilizar la secuencia de cADN. En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para determinar la capacidad de una sustancia candidata para inhibir la expresión de un gen UC41 que comprende la secuencia de polinucleótidos que se expone en cualquiera de las SEQ. ID. N° 1, 3 o 4. El método se compone de los pasos siguientes:

(a) proporcionar al menos una célula de expresión de UC41

(b) poner en contacto dicha célula con la sustancia candidata;

(c) medir el nivel de expresión de UC41 en la mencionada célula; y

(d) comparar el nivel de expresión de UC41 de la célula medido en el paso con el nivel de expresión de UC41 medido antes de poner en contacto la célula con la sustancia candidata.

En otro aspecto de la presente invención, se prevé el uso de una célula que expresa un gen UC41 que comprende la secuencia de polinucleótidos expuesta en las SEQ. ID. N° 1, 3 o 4 para detectar la presencia de moduladores de la expresión de UC41.

La presente divulgación aborda las deficiencias existentes en el campo hasta la fecha, identificando un nuevo gen específico de la próstata que se expresa de forma diferenciada en el cáncer de próstata humano en comparación con la próstata humana normal o la hiperplasia prostática benigna (BPH). Las especies de mRNA codificado y las correspondientes especies de proteína codificada tienen utilidad, por ejemplo, como marcadores del cáncer de próstata.

Los anticuerpos contra las especies de proteína codificada, así como las estructuras antisentido específicas para las especies de mRNA, tienen utilidad para los métodos de tratamiento terapéutico del cáncer de próstata. Por otra parte, la secuencia de cADN se puede utilizar para diseñar sondas y cebadores para la identificación de una secuencia genómica de longitud completa, así como de la secuencia promotora del gen, lo que resulta útil para el diseño de vectores de expresión específicos de la próstata válidos en la terapia genética del cáncer de próstata.

La secuencia de ácido nucleico de este nuevo gen específico de la próstata se puede emplear para diseñar cebadores y sondas de oligonucleótidos específicos. Cuando se emplean en combinación con procedimientos de amplificación e hibridación del ácido nucleico, estas sondas y cebadores permiten analizar rápidamente muestras centrales de la biopsia prostática, muestras de suero, etc. Esto ayudará a los médicos a diagnosticar el cáncer de próstata y a determinar los regímenes de tratamiento óptimos para los individuos con tumores de próstata de diversas malignidades. Las mismas sondas y cebadores también se pueden utilizar para la detección y el diagnóstico del cáncer de próstata mediante hibridación *in situ* o PCR™ *in situ*.

La nueva secuencia genética también se puede emplear para identificar y aislar una secuencia de ADN genómico de longitud completa y sus elementos reguladores asociados, incluyendo el promotor, de las bibliotecas de ADN humano genómico. La secuencia de cADN identificada en la presente invención se emplea en primer lugar para construir sondas de hibridación para explorar bibliotecas de ADN genómico humano mediante técnicas estándar. Una vez que se han identificado clones genómicos parciales, los genes de longitud completa son aislados mediante «marcha cromosómica» (también denominada «hibridación por superposición»). Véase Chinault y Carbon, 1979. Las secuencias no repetitivas que se encuentran en los extremos o cerca de los extremos de los clones genómicos parciales se utilizan posteriormente como sondas de hibridación en la exploración de otras 20 bibliotecas genómicas, permitiendo finalmente el aislamiento de la secuencia genómica completa para el nuevo gen específico de la próstata aquí presentado. Las personas con experiencia en el campo apreciarán que los genes de longitud completa se pueden obtener utilizando la secuencia de cADN descrita en el presente, utilizando la tecnología actualmente disponible (Sambrook *et al*, 1989; Chinault and Carbon, 1979).

En la práctica de este método, la secuencia de cADN identificada en la presente divulgación se emplea como sonda de hibridación para explorar bibliotecas de ADN genómico humano mediante técnicas estándar. En una práctica preferible, se obtiene una biblioteca de ADN genómico humano de alta calidad de fuentes comerciales o de otras fuentes. La biblioteca se coloca en placas, por ejemplo, placas de agarosa que contienen nutrientes, antibióticos y otros ingredientes estándar. Las colonias individuales son transferidas a membranas de nitrocelulosa o nylon y las sondas de cADN son hibridadas con las secuencias complementarias sobre las membranas. La hibridación se detecta mediante etiquetas unidas a enzimas o radiactivas asociadas con las sondas hibridadas. Las colonias positivas se cultivan y se secuencian mediante, por ejemplo, el método dideoxi de secuenciación de nucleótidos o con métodos similares conocidos en el campo. La comparación de las secuencias clonadas con secuencias genómicas o de cADN animal o humano conocidas se realiza utilizando programas informáticos y bases de datos bien conocidas para una persona cualificada en el campo.

En una realización de la presente divulgación, los ácidos nucleicos aislados de la presente divulgación se incorporan a vectores de expresión y se expresan como las proteínas o péptidos codificados. Estas proteínas o péptidos pueden utilizarse, en determinadas realizaciones, como antígenos para la inducción de la producción de anticuerpos monoclonales o policlonales.

Por tanto, un aspecto de la presente divulgación consiste en cebadores y sondas de hibridación de oligonucleótidos que se hibridan selectivamente con muestras del cáncer de próstata. Estas sondas y cebadores son seleccionados de las secuencias denominadas en el presente SEQ. ID. Nº 1, SEQ. ID. Nº 3 y SEQ. ID. Nº 4. La disponibilidad de sondas y cebadores específicos para estas secuencias de ácido nucleico específicas de la próstata, que se expresan de forma diferenciada en el cáncer de próstata, proporciona la base para kits de diagnóstico útiles para distinguir entre la BPH, el cáncer confinado al órgano prostático y los tumores prostáticos metastásicos. Alternativamente, la disponibilidad de sondas y cebadores que se hibridan con uno o más ácidos nucleicos correspondientes a la SEQ. ID. Nº 1, la SEQ. ID. Nº 3 o la SEQ. ID. Nº 4, sienta la base para kits de diagnóstico útiles en la detección del cáncer de próstata.

En un aspecto más general, la presente divulgación abarca kits útiles para la detección de células cancerígenas prostáticas en una muestra biológica. Este kit puede comprender uno o más pares de cebadores para la amplificación de los ácidos nucleicos correspondientes a la SEQ. ID. Nº 1, SEQ. ID. Nº 3 o SEQ. ID. Nº 4. El kit

puede comprender también muestras del mRNA total obtenido del tejido de diversos estados fisiológicos, como el estado normal, BPH, tumor confinado y tumor progresivo con metástasis, por ejemplo, para utilizarlos como controles. El kit también puede comprender tampones, bases de nucleótidos y otras composiciones que se emplearán para las reacciones de hibridación y/o amplificación. Cada solución o composición puede estar contenida en un vial o botella y todos los viales confinados en una caja para su comercialización. Otra realización de la presente divulgación comprende un kit para emplearlo en la detección de las células cancerígenas prostáticas en una muestra biológica que comprende sondas de oligonucleótidos efectivas para unirse con una gran afinidad a los ácidos nucleicos correspondientes a las SEQ. ID. Nº 1, SEQ. ID. Nº 3 o SEQ. ID. Nº 4, en un inmunoensayo Northern blot y recipientes para cada una de estas sondas. En otra realización, la divulgación comprende un kit para utilizarlo en la detección de células cancerígenas prostáticas en una muestra biológica que comprende anticuerpos específicos para las proteínas codificadas por los ácidos nucleicos correspondientes a las SEQ. ID. Nº 1, SEQ. ID. Nº 3 o SEQ. ID. Nº 4, identificadas en la presente divulgación.

En un aspecto más general, la presente divulgación abarca métodos para tratar a pacientes con cáncer de próstata mediante la administración de cantidades efectivas de anticuerpos específicos para los productos peptídicos de los ácidos nucleicos correspondientes a las SEQ. ID. Nº 1, SEQ. ID. Nº 3 o SEQ. ID. Nº 4, o bien mediante la administración de cantidades efectivas de vectores que producen RNA mensajeros antisentido que se unen a los ácidos nucleicos correspondientes a las SEQ. ID. Nº 1, SEQ. ID. Nº 3 o SEQ. ID. Nº 4, inhibiendo así la expresión de los productos proteicos de un gen específico de la próstata al 4% que está sobreexpresado en el cáncer de próstata. Las moléculas de ácido nucleico antisentido también se pueden proporcionar como RNA, dado que algunas formas estables de RNA con una vida útil prolongada que se pueden administrar directamente, sin necesidad de utilizar un vector, son conocidas en el campo. Por otra parte, se pueden administrar estructuras de ADN en las células a través de liposomas, transfección mediada por receptores y otros métodos conocidos en el campo. La administración de los presentes agentes, por cualquier medio conocido en el campo, estaría incluida en las presentes reivindicaciones.

Un aspecto de la presente divulgación consiste en nuevos segmentos de ácido nucleico aislados, que resultan útiles como se describe en el presente como cebadores y sondas de hibridación que se hibridan específicamente con los ácidos nucleicos correspondientes a las SEQ. ID. Nº 1, SEQ. ID. Nº 3 o SEQ. ID. Nº 4. Estos ácidos nucleicos se describen en el presente como especies que se ha demostrado que se expresan de forma diferenciada en el cáncer de próstata, en comparación con la BPH y el tejido prostático normal. La divulgación comprende también un ácido nucleico aislado de entre unas 14 y unas 100 bases de longitud, idénticas o bien complementarias a una porción de la misma longitud presente dentro de las secuencias divulgadas.

La presente divulgación comprende proteínas y péptidos con secuencias de aminoácidos codificadas por los mencionados segmentos de ácido nucleico divulgados.

La divulgación comprende también métodos para detectar células cancerígenas prostáticas en muestras biológicas, empleando las sondas y los cebadores de hibridación diseñados específicamente para hibridarse con los ácidos nucleicos correspondientes a las SEQ. ID. Nº 1, SEQ. ID. Nº 3 o SEQ. ID. Nº 4. Este método comprende también la medición de las cantidades de los productos de la amplificación de ácido nucleico que se forman cuando se emplean cebadores seleccionados de las secuencias mencionadas.

La divulgación comprende también el pronóstico y/o diagnóstico del cáncer de próstata midiendo las cantidades de los productos de la amplificación de ácido nucleico que se forman como se ha mencionado. La divulgación comprende métodos para tratar a individuos con cáncer de próstata, proporcionando cantidades efectivas de anticuerpos y/o moléculas de ADN antisentido que se unen a los productos de los mencionados ácidos nucleicos aislados. La divulgación comprende también kits para la realización de los mencionados procedimientos, que contienen anticuerpos, cebadores de amplificación y/o sondas de hibridación.

La presente divulgación comprende también la producción de anticuerpos específicos para las proteínas o los péptidos codificados por los ácidos nucleicos correspondientes a las SEQ. ID. Nº 1, SEQ. ID. Nº 3 o SEQ. ID. Nº 4, y el uso de estos anticuerpos para aplicaciones de diagnóstico en la detección del cáncer de próstata. La divulgación comprende también el tratamiento terapéutico del cáncer de próstata mediante la administración de dosis efectivas de inhibidores específicos para las mencionadas proteínas codificadas.

3. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS ILUSTRACIONES

FIG. 1. Identificación del clon de cADN del UC41 y confirmación de la expresión diferenciada. Cuadro A. Resultados de un estudio de visualización diferenciada basada en gel de agarosa, en el que se compara el RNA de los tejidos prostáticos normales (N) con el RNA de los tejidos prostáticos cancerosos (C). La posición de la banda de UC41 se encuentra en la parte inferior del cuadro, justo por encima de la etiqueta "UC41". Cuadro B. Confirmación de la expresión diferenciada de UC41 mediante RT-PCR™ de tejidos prostáticos normales (N) y tejidos prostáticos cancerosos (C). La posición de la banda de UC41 en este cuadro se encuentra junto a la etiqueta "UC41".

FIG. 2. Expresión de UC41 en tejidos cancerosos y normales emparejados. El tejido emparejado fue microdisecionado de prostatectomías radicales en OCT, tal y como se describe más adelante en la sección MATERIAL Y MÉTODOS. Se empleó RT-PCR™ de β -2-microglobulina como control. Las muestras emparejadas eran de tejidos prostáticos normales (N) y tejidos prostáticos cancerosos adyacentes (C). El elemento insertado de la parte derecha de la FIG. muestra los resultados de la RT-PCR™ para UC41 y β -2-microglobulina en las líneas celulares LNCaP, PC-3 y DU145 del cáncer de próstata y los xenoinjertos Lu 23 y Lu 35 del cáncer de próstata.

FIG. 3. Hibridación *in situ* realizada con sondas sentido y antisentido con digoxigenina-dUTP, tal como se describe más adelante en la sección MATERIAL Y MÉTODOS. El UC41 se expresó predominantemente en las células basales de la próstata normal (lado izquierdo). Su expresión se reguló al alza en el cáncer de próstata (centro y lado derecho).

FIG. 4. Hibridación *in situ* realizada con sondas sentido y antisentido etiquetadas con digoxigenina-dUTP, tal como se describe más adelante en la sección MATERIAL Y MÉTODOS. El UC41 se expresó predominantemente en las células basales de la próstata normal (lado izquierdo). Su expresión se reguló al alza en el cáncer de próstata con metástasis en los nódulos linfáticos (centro y lado derecho).

FIG. 5. Hibridación *in situ* realizada con sondas sentido y antisentido con digoxigenina-dUTP, tal como se describe más adelante en la sección MATERIAL Y MÉTODOS. El UC41 se expresó predominantemente en las células basales de la próstata normal (lado izquierdo). Su expresión se reguló al alza en el cáncer de próstata con metástasis en huesos (centro y lado derecho).

FIG. 6. Expresión de UC41 en diferentes tejidos normales analizados mediante hibridación con ensayo Northern blot. El ensayo Northern blot de múltiples tejidos humanos (Clontech, 2 μ g de poli A+ RNA por línea) se realizó tal como se describe más adelante en la sección MATERIAL Y MÉTODOS. La expresión relativa de UC41 se mostró en el bazo humano (línea 1), el timo (línea 2), la próstata (línea 3), los testículos (línea 4), el ovario (línea 5), el intestino delgado (línea 6), el colon (revestimiento mucoso, línea 7) y tejidos de leucocitos en la sangre periférica (línea 8). La banda de UC41 de aproximadamente 2,4 kb se expresa solamente en el tejido prostático normal.

FIG. 7. Confirmación de la expresión específica de la próstata en UC41 mediante ensayo slot blot. Se elaboró una sonda con un filtro maestro de RNA humano (Clontech, 89-514 ng de poli A+RNA por línea) y una sonda específica para UC41, tal como se describe más adelante en la sección MATERIAL Y MÉTODOS. La expresión de UC41 se examinó en las muestras de RNA de (fila superior) cerebro completo, amígdala, núcleo caudado, cerebelo, corteza cerebral, lóbulo frontal, hipocampo, bulbo raquídeo, (segunda fila) lóbulo occipital, putamen, sustancia negra, lóbulo temporal, tálamo, núcleo accumbens, médula espinal, (tercera fila) corazón, aorta, músculo esquelético, colon, vejiga, útero, próstata, estómago, (cuarta fila) testículos, ovarios, páncreas, glándula pituitaria, glándula adrenal, glándula tiroides, glándula salival, glándula mamaria, (quinta fila) riñón, hígado, intestino delgado, bazo, timo, leucocito periférico, nódulo linfático, médula ósea, (sexta fila) apéndice, pulmón, tráquea, placenta, (séptima fila) cerebro fetal, corazón fetal, riñón fetal, hígado fetal, bazo fetal, timo fetal, pulmón fetal, (fila inferior) RNA total de levadura, tRNA de levadura, rRNA de *E. coli*, ADN de *E. coli*, Poli r(A), ADN CotI humano, ADN humano (100 ng) y ADN humano (500 ng).

FIG. 8. Resultados del mapeo FISH de UC41. Cuadro A: muestra las señales de FISH sobre un cromosoma en metafase. Cuadro B: muestra la misma figura mitótica teñida con DAPI para identificar el cromosoma 3. Cuadro C: muestra un diagrama de los resultados del mapeo FISH, donde cada punto representa las señales FISH dobles detectadas en el cromosoma humano 3.

FIG. 9. Análisis de la secuencia de cADN de UC41 (SEQ. ID. N° 1). Se muestra la secuencia de cADN de UC41 y la secuencia de aminoácidos prevista. La secuencia líder se indica mediante el subrayado doble. La región transmembrana prevista está subrayada en negrita. La predicción de la región transmembrana se basa en análisis estadísticos de Tmbase, una base de datos de proteínas transmembrana naturalmente presentes.

4. DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El trabajo anterior de los presentes y otros inventores ha permitido la identificación de un marcador de secuencia expresada (EST), denominado UC41, cuya expresión se incrementa en las células cancerígenas prostáticas en comparación con los tejidos prostáticos benignos o normales. Estos y otros resultados se documentaron en la Patente estadounidense nº 5.882.864.

La presente invención divulga toda la secuencia de cADN del gen UC41 (SEQ. ID. N° 1), e identifica el UC41 como un nuevo gen específico de la próstata cuya expresión se regula al alza en el cáncer de próstata. Como tal, el gen UC41 es un indicador de la transformación maligna de los tejidos prostáticos. Una persona con conocimientos en el

campo reconocerá que este gen específico de la próstata expresado de forma diferenciada tiene utilidad en la detección temprana, el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer de próstata.

Aquellos versados en la materia apreciarán que las secuencias de ácido nucleico divulgadas en el presente tendrán utilidad en diversas aplicaciones para la detección, el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer de próstata. Algunos ejemplos de estas aplicaciones comprenden la amplificación de uno o más ácidos nucleicos correspondientes a las SEQ. ID. N° 1, 3 o 4, utilizando cebadores específicos; la detección de ácidos nucleicos correspondientes a las SEQ. ID. N° 1, 3 o 4, mediante hibridación con sondas de oligonucleótidos; incorporación de ácidos nucleicos aislados a vectores; expresión de RNA, péptidos o polipéptidos de los vectores; desarrollo de reactivos inmunológicos correspondientes a las proteínas codificadas por los ácidos nucleicos aislados correspondientes a las SEQ. ID. N° 1, 3 o 4; y tratamientos terapéuticos del cáncer de próstata utilizando anticuerpos, ácidos nucleicos antisentido u otros inhibidores específicos para los productos genéticos específicos de la próstata identificados.

4.1 Ácidos nucleicos

Como se describe en el presente, un aspecto de la presente divulgación son los ácidos nucleicos correspondientes a las SEQ. ID. N° 1, SEQ. ID. N° 3 o SEQ. ID. N° 4. Estas secuencias, a su vez, corresponden a: la secuencia completa del cADN de UC41 (SEQ. ID. N° 1, FIG. 9); la secuencia del cADN de UC41 que se encuentra en 5' con respecto a la secuencia EST de UC41 divulgada en la Patente estadounidense n° 5.882.864 (SEQ. ID. N° 3, FIG. 9, bases 1-1322 de la secuencia de cADN); y la secuencia del cADN de UC41 que se encuentra en 3' con respecto a la secuencia EST de UC41 (SEQ. ID. N° 4, FIG. 9, bases 1501 -1934 de la secuencia de cADN).

Las secuencias de ácido nucleico divulgadas en el presente tendrán utilidad como sondas de hibridación o cebadores de amplificación. Estos ácidos nucleicos se pueden utilizar, por ejemplo, en la evaluación de diagnóstico de muestras de tejido o bien emplearse para clonar clones genómicos de longitud completa, incluyendo el promotor y otras secuencias reguladoras correspondientes a los mismos. En determinadas realizaciones, estas sondas y cebadores se componen de fragmentos de oligonucleótidos. Estos fragmentos deberían tener una longitud suficiente como para proporcionar una hibridación específica con una muestra de tejido de ADN o RNA. Típicamente las secuencias tendrán 10-20 nucleótidos, aunque podrán ser más largas. Las secuencias más largas, por ejemplo de 40, 50, 100, 500 e incluso de longitud completa, son preferibles para determinadas realizaciones.

Se contemplan las moléculas de ácido nucleico que tienen tramos contiguos de unos 10, 13, 15, 17, 18,19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800 o 1900 nucleótidos, hasta la longitud completa de las secuencias divulgadas, de una secuencia seleccionada de la SEQ. ID. N° 3 y SEQ. ID. N° 4. También se contemplan las moléculas que son complementarias a las mencionadas secuencias y que se unen a estas secuencias en condiciones sumamente rigurosas. Estas sondas serán útiles en diversas realizaciones de hibridación, como los ensayos Southern y Northern blot. En algunos casos, se contempla el uso de sondas que se hibridan con múltiples secuencias diana sin comprometer su capacidad para diagnosticar el cáncer de forma efectiva.

Se pueden diseñar diversas sondas y cebadores con respecto a las secuencias de nucleótidos divulgadas. Los cebadores pueden tener cualquier longitud, aunque, típicamente, tienen unas 10-20 bases de longitud. Al asignar valores numéricos a una secuencia, por ejemplo, el primer residuo es 1, el segundo residuo es 2, etc., se puede proponer un algoritmo que defina a todos los cebadores:

$$n \text{ a } n + y$$

en la que "n" es un número entero de 1 al último número de la secuencia e "y" es la longitud del cebador menos uno (9 a 19), donde "n" + "y" no es superior al último número de la secuencia. Así, para una 10-mer, las sondas corresponden a las bases 1 a 10, 2 a 11, 3 a 12, etc. Para una 15-mer, las sondas corresponden a las bases 1 a 15, 2 a 16, 3 a 17, etc. Para una 20-mer, las sondas corresponden a las bases 1 a 20, 2 a 21, 3 a 22, etc.

Los valores de "n" en el algoritmo anterior para cada una de las secuencias de ácido nucleico es: SEQ. ID. N° 3, n=1322; SEQ. ID. N° 4, n=434.

El uso de una sonda de hibridación de entre 14 y 100 nucleótidos de largo permite la formación de una molécula dúplex que es tan estable como selectiva. Por lo general, son preferibles las moléculas que tienen secuencias complementarias sobre tramos de más de 20 bases de longitud, a fin de incrementar la estabilidad y selectividad del híbrido y, de este modo, mejorar la calidad y el grado de las moléculas concretas del híbrido obtenidas. Por lo general, será preferible diseñar moléculas de ácido nucleico que tengan tramos de 20 a 30 nucleótidos, o incluso más largas cuando sea recomendable. Estos fragmentos se pueden preparar fácilmente, por ejemplo, sintetizando

directamente el fragmento por medios químicos o introduciendo secuencias seleccionadas en vectores recombinantes para la producción recombinante.

5 Por consiguiente, las secuencias de nucleótidos de la divulgación pueden ser utilizadas por su capacidad para formar de forma selectiva moléculas dúplex con tramos complementarios de genes o RNA o para proporcionar cebadores para la amplificación de ADN o RNA de los tejidos. Dependiendo de la aplicación prevista, puede ser recomendable emplear diversas condiciones de hibridación, a fin de conseguir diferentes grados de selectividad de la sonda con respecto a la secuencia diana.

10 Para las aplicaciones que requieran una elevada selectividad, será recomendable emplear unas condiciones relativamente rigurosas para formar los híbridos, por ejemplo, se seleccionarán unas condiciones con unos niveles relativamente bajos de sal y/o alta temperatura, como las proporcionadas por unos 0,02 M a unos 0,10 M de NaCl a temperaturas de unos 50°C a unos 70°C. Estas condiciones altamente rigurosas toleran poco o ningún desajuste entre la sonda y la plantilla o la variedad diana, por lo que resultarían particularmente adecuadas para aislar genes específicos o detectar transcripciones específicas de mRNA. Por lo general, se considera que se puede aumentar la rigurosidad de las condiciones mediante la adición de cantidades crecientes de formamida.

15 Para determinadas aplicaciones como, por ejemplo, la sustitución de aminoácidos mediante mutagénesis de sitio dirigido, se aprecia que se precisan unas condiciones menos rigurosas. En estas condiciones, la hibridación puede ocurrir aún cuando las secuencias de la sonda y la variedad diana no sean perfectamente complementarias y presenten un desajuste en una o más posiciones. Se puede reducir la rigurosidad de las condiciones aumentando la concentración de sal y reduciendo la temperatura. Por ejemplo, unas condiciones de rigurosidad media serían las proporcionadas por unos 0,1 a 0,25 M de NaCl a temperaturas de unos 37°C a unos 55°C, mientras que unas condiciones de rigurosidad baja serían las proporcionadas por unos 0,15 M a unos 0,9 M de sal, a temperaturas de entre unos 20°C y unos 55°C. Por tanto, las condiciones de hibridación se pueden manipular fácilmente, por lo que generalmente éste será el método preferido dependiendo de los resultados deseados.

25 Puede emplearse el siguiente gráfico de codones, en un programa mutagénico de sitio dirigido, para producir ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos de un determinado ácido nucleico iguales o ligeramente diferentes.

TABLA 1

Aminoácidos				Codones					
Alanina	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU			
Cisteína	Cys	C	UGC	UGU					
Ácido aspártico	Asp	D	GAC	GAU					
Ácido glutámico	Glu	E	GAA	GAG					
Fenilalanina	Phe	F	UUC	UUU					
Glicina	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU			
Histidina	His	H	CAC	CAU					
Isoleucina	De	I	AUA	AUC	AUU				
Lisina	Lys	K	AAA	'AAG					
Leucina	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU	
Metionina	Met	M	AUG						
Asparagina	Asn	N	AAC	AAU					
Prolina	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU			
Glutamina	Gin	Q	CAA	CAG					
Arginina	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU	
Serina	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU	
Treonina	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU			
Valina	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU			
Triptófano	Trp	W	UGG						
Tirosina	Tyr	Y	UAC	UAU					

30 En otras realizaciones, la hibridación se puede conseguir en condiciones, por ejemplo, de 50 mM de Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂, 10 mM de diotretitol, a temperaturas de entre unos 20°C y unos 37°C. Otras condiciones de hibridación utilizadas podrían incluir unos 10 mM de Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM de KCl, 1.5 µM de MgCl₂, a temperaturas de entre unos 40°C y unos 72°C.

En determinadas realizaciones, será beneficioso emplear secuencias de ácido nucleico de la presente invención en combinación con un medio apropiado, como un marcador, para determinar la hibridación. En el campo se conoce una amplia variedad de medios indicadores apropiados, incluyendo los ligandos fluorescentes, radiactivos y enzimáticos, entre otros, como la avidina/biotina, que pueden ser detectados. En realizaciones preferibles, podría resultar recomendable emplear una etiqueta fluorescente o un marcador enzimático, como ureasa, fosfatasa alcalina o peroxidasa, en lugar de un reactivo radiactivo u otros reactivos no recomendados desde el punto de vista medioambiental. En el caso de los marcadores enzimáticos, se conocen sustratos indicadores colorimétricos que pueden ser empleados para proporcionar un medio de detección visible para el ojo humano o espectrofotométricamente, para identificar la hibridación específica con las muestras que contienen el ácido nucleico complementario.

Por lo general, se prevé que las sondas de hibridación descritas en el presente resultarán útiles no solamente como reactivos en la hibridación de soluciones, como la PCR™, para detectar la expresión de los genes correspondientes, sino también en las realizaciones que emplean una fase sólida. En las realizaciones que implican una fase sólida, el ADN (o RNA) de ensayo es adsorbido o fijado de otro modo a una superficie o matriz seleccionada. Este ácido nucleico de cadena única fijado es posteriormente sometido a hibridación con sondas seleccionadas en las condiciones deseadas. Las condiciones seleccionadas dependerán de las circunstancias concretas basadas en los criterios particulares necesarios (dependiendo, por ejemplo, del contenido de G+C, el tipo de ácido nucleico diana, el origen del ácido nucleico, el tamaño de la sonda de hibridación, etc.). Tras el lavado de la superficie hibridada para eliminar las moléculas de la sonda enlazadas de forma no específica, se detecta la hibridación, o incluso se cuantifica, por medio de la etiqueta.

Se entenderá que esta divulgación no se limita a las sondas concretas divulgadas en el presente y que, en particular, pretende abarcar al menos las secuencias de ácido nucleico que se pueden hibridar con las secuencias divulgadas o que son análogos de secuencias funcionales de esas secuencias. Por ejemplo, se puede emplear una secuencia parcial para identificar un gen estructuralmente relacionado o el clon de cADN o genómico de longitud completa del que se deriva. Las personas cualificadas en el campo conocen bien los métodos para generar bibliotecas genómicas y de cADN que se pueden utilizar como diana para las sondas anteriormente descritas (Sambrook et al, 1989).

Para las aplicaciones en las que los segmentos de ácido nucleico de la presente divulgación se incorporan a vectores, como plásmidos, cósmidos o virus, estos segmentos se pueden combinar con otras secuencias de ADN, como promotores, señales de poliadenilación, sitios de la enzima de restricción, sitios de clonación múltiple, otros segmentos de codificación y similares, de forma que su longitud completa puede variar de forma considerable. Se contempla que se puede emplear un fragmento de ácido nucleico prácticamente de cualquier longitud, estando la longitud total preferiblemente limitada por la facilidad de preparación y el uso en el protocolo de ADN recombinante previsto.

Se pueden introducir segmentos de ADN que codifican un gen específico en células hospedadoras recombinantes y emplearse para expresar una proteína reguladora o estructural concreta. Alternativamente, mediante la aplicación de técnicas de ingeniería genética, se pueden emplear subporciones o derivados de genes seleccionados. Se pueden aislar las regiones corriente arriba que contienen regiones reguladoras como regiones promotoras y posteriormente emplearse para la expresión del gen seleccionado.

Cuando se vaya a generar un producto de expresión, la secuencia de ácido nucleico se puede variar, manteniendo al mismo tiempo su capacidad para codificar el mismo producto. La consulta del gráfico de codones que se recoge más arriba permitirá a aquellos versados en la materia diseñar cualquier ácido nucleico que codifique el producto de un determinado ácido nucleico.

4.2 Proteínas codificadas

Una vez que se ha determinado la secuencia de codificación completa del gen específico de la próstata expresado de forma diferenciada, el gen se puede insertar en un sistema de expresión apropiado. El gen se puede expresar en cualquier número de sistemas de expresión de ADN recombinante diferentes para generar grandes cantidades del producto polipeptídico, que pueden posteriormente ser purificadas y empleadas para vacunar a animales, a fin de generar antisueros con los que realizar nuevos estudios.

Algunos ejemplos de sistemas de expresión conocidos por las personas cualificadas en el campo incluyen bacterias, como *E. coli*, levaduras, como *Pichia pastoris*, baculovirus y sistemas de expresión en mamíferos, como las células COS o CHO. Se puede expresar un gen completo o, alternativamente, se pueden producir fragmentos del gen que codifica porciones del polipéptido.

- En determinadas aplicaciones generales de la divulgación, la secuencia de genes que codifica el polipéptido es analizada para detectar secuencias transmembrana putativas. Típicamente, estas secuencias son muy hidrófobas y se detectan fácilmente mediante el uso de un software estándar para el análisis de secuencias, como MacVector (D3I, New Haven, CT). A menudo, la presencia de secuencias transmembrana es perjudicial cuando una proteína recombinante es sintetizada en muchos sistemas de expresión, especialmente *E. coli*, dado que provoca la producción de agregados insolubles que son difíciles de renaturalizar en la conformación nativa de la proteína. La delección de las secuencias transmembrana típicamente no altera de forma significativa la conformación del resto de la estructura de la proteína.
- Por otra parte, las secuencias transmembrana, al estar, por definición, introducidas en una membrana, resultan inaccesibles. Por tanto, los anticuerpos para estas secuencias pueden no resultar útiles en estudios *in vivo* o *in situ*. La delección de secuencias que codifican transmembranas de los genes empleados para la expresión se puede conseguir mediante técnicas estándar. Por ejemplo, los sitios de la enzima de restricción colocados fortuitamente pueden ser empleados para suprimir el fragmento de genes deseado, o bien se puede utilizar la amplificación de tipo PCR™ para amplificar solamente la parte deseada del gen.
- Se puede utilizar el análisis informático de la secuencia para determinar la ubicación de los principales epitopos determinantes antigénicos previstos del polipéptido. El software capaz de realizar este análisis se puede adquirir fácilmente en el mercado, por ejemplo MacVector (IBI, New Haven, CT). El software emplea típicamente algoritmos estándar, como los métodos Kyte/Doolittle o Hopp/Woods para ubicar secuencias hidrófilas que se pueden encontrar en la superficie de las proteínas y que, por tanto, es probable que actúen como determinantes antigénicos.
- Una vez que se ha hecho este análisis, pueden prepararse polipéptidos que contengan al menos las características esenciales del determinante antigénico y que puedan ser empleados en la generación de antisueros contra el polipéptido. Los minigenes o fusiones de genes que codifican estos determinantes se pueden construir e insertar en vectores de expresión mediante métodos estándar, por ejemplo, utilizando la metodología de clonación PCR™.
- El gen o fragmento de gen que codifica un polipéptido se puede insertar en un vector de expresión mediante técnicas de subclonación estándar. Se puede utilizar un vector de expresión de *E. coli* que produce el polipéptido recombinante como una proteína de fusión, permitiendo una rápida purificación de afinidad de la proteína. Algunos ejemplos de estos sistemas de expresión de la proteína de fusión son el sistema de glutatión S-transferasa (Pharmacia, Piscataway, NJ), el sistema de proteína de unión a maltosa (iVEB, Beverly, MA), el sistema FLAG (IBI, New Haven, CT), y el sistema 6xHis (SEQ. ID. Nº 16) (Qiagen, Chatsworth, CA).
- Algunos de estos sistemas producen polipéptidos recombinantes que portan solamente un pequeño número de aminoácidos adicionales, que es poco probable que afecten a la capacidad antigénica del polipéptido recombinante. Por ejemplo, tanto el sistema FLAG como el sistema 6xHis (SEQ. ID. Nº 16) añaden solamente secuencias cortas. Se sabe que ambos son escasamente antigénicos y que no afectan de forma negativa al plegado del polipéptido hasta su conformación nativa. Otros sistemas de fusión están diseñados para producir fusiones en las que el socio de fusión se suprime fácilmente del polipéptido deseado. En una realización, el socio de fusión está unido al polipéptido recombinante a través de una secuencia peptídica que contiene una secuencia de reconocimiento específica para una proteasa. Algunos ejemplos de secuencias adecuadas son aquellas reconocidas por la proteasa del virus del grabado del tabaco (Life Technologies, Gaithersburg, MD) o el Factor Xa (New England Biolabs, Beverly, MA).
- El sistema de expresión empleado también puede ser uno dirigido por el promotor polihedrón baculovirus. El gen que codifica el polipéptido puede ser manipulado mediante técnicas estándar, a fin de facilitar la clonación en el vector de baculovirus. Un vector de baculovirus es el vector pBlueBac (Invitrogen, Sorrento, CA). El vector que porta el gen para el polipéptido es transfectado en células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) mediante protocolos estándar, y las células son cultivadas y procesadas para producir el antígeno recombinante. Véase Summers et al., Patente estadounidense nº 4.215.051.
- Como una alternativa a los polipéptidos recombinantes, se pueden preparar los péptidos sintéticos correspondientes a los determinantes antigénicos. Estos péptidos tienen al menos seis residuos de aminoácidos de longitud y pueden contener hasta unos 35 residuos, que es aproximadamente el límite de longitud máximo de las máquinas de síntesis de péptidos automatizada, como las que comercializa Applied Biosystems (Foster City, CA). El uso de estos pequeños péptidos para la vacunación requiere típicamente la conjugación del péptido con una proteína portadora inmunogénica, como el antígeno de superficie de la hepatitis B, la hemocianina de la lapa californiana o la albúmina sérica bovina. Los métodos para realizar esta conjugación son bien conocidos en el campo.
- También se pueden preparar variantes de la secuencia de aminoácidos del polipéptido. Estas pueden ser, por ejemplo, variantes menores de la secuencia del polipéptido que surgen debido a la variación natural dentro de la población o pueden ser homólogos encontrados en otras especies. También pueden ser secuencias que no se

encuentran naturalmente presentes pero que son lo suficientemente similares como para funcionar de forma similar y/o provocar una respuesta inmunológica que genera una reacción cruzada con las formas naturales del polipéptido. Las variantes de la secuencia se pueden preparar mediante métodos estándar de mutagénesis de sitio dirigido, como las aquí descritas para suprimir la secuencia transmembrana.

5 Las variantes de la secuencia de aminoácidos del polipéptidos pueden ser variantes de sustitución, inserción o
deleción. Las variantes de deleción carecen de uno o más residuos de la proteína nativa que no son esenciales para
la función o la actividad inmunogénica y un ejemplo de ello son las variantes que carecen de una secuencia
transmembrana. Otro tipo común de variante de deleción es aquel que carece de secuencias de señal secretora o
10 secuencias de señal que dirigen a una proteína a unirse a una parte concreta de una célula. Un ejemplo de esta
última secuencia es el dominio SH2, que induce la unión de la proteína con los residuos de fosfotirosina.

Las variantes de sustitución contienen típicamente un aminoácido alternativo en uno o más sitios dentro de la
proteína y pueden ser diseñadas para modular una o más propiedades del polipéptido, como la estabilidad frente al
clivaje proteolítico. Las sustituciones son preferiblemente conservadoras, es decir que un aminoácido es sustituido
15 por otro de un tamaño y una carga similares. Las sustituciones conservadoras son bien conocidas en el campo e
incluyen, por ejemplo, los cambios de: alanina por serina; arginina por lisina; asparagina por glutamina o histidina;
aspartato por glutamato; cisteína por serina; glutamina por asparagina; glutamato por aspartato; glicina por prolina;
histidina por asparagina o glutamina; isoleucina por leucina o valina; leucina por valina o isoleucina; lisina por
20 arginina, glutamina, o glutamato; metionina por leucina o isoleucina; fenilalanina por tirosina, leucina o metionina;
serina por treonina; treonina por serina; triptófano por tirosina; tirosina por triptófano o fenilalanina; y valina por
isoleucina o leucina.

Las variantes de inserción incluyen proteínas de fusión como las utilizadas para permitir la purificación rápida del
polipéptido y también pueden incluir proteínas híbridas que contienen secuencias de otras proteínas y polipéptidos
que son homólogos del polipéptido. Por ejemplo, una variante de inserción puede incluir porciones de la secuencia
de aminoácidos de polipéptido de una especie, junto con porciones del polipéptido homólogo de otra especie. Otras
25 variantes de inserción pueden incluir aquellas en las que los aminoácidos adicionales se introducen dentro de la
secuencia de codificación del polipéptido. Típicamente, éstas son inserciones menores que las proteínas de fusión
anteriormente descritas y se introducen, por ejemplo, para alterar un sitio de clivaje de proteasa.

Los principales determinantes antigénicos del polipéptido pueden ser identificados mediante un planteamiento
empírico en el que las porciones del gen que codifica el polipéptido son expresadas en un huésped recombinante y
las proteínas resultantes son testadas para comprobar su capacidad para provocar una respuesta inmunológica. Por
ejemplo, se puede utilizar la PCR™ para preparar una serie de péptidos que carecen de fragmentos cada vez más
largos del extremo C-terminal de la proteína. La actividad inmunoprotectora de cada uno de estos péptidos identifica
30 después los fragmentos o dominios del polipéptido que son esenciales para esta actividad. Otros estudios en los que
solamente se suprime un pequeño número de aminoácidos en cada iteración permite posteriormente la localización
de los determinantes antigénicos del polipéptido.

Otro método para la preparación de los polipéptidos es el uso de peptidomiméticos. Los miméticos son moléculas
que contienen péptidos y que imitan a elementos de la estructura secundaria de la proteína. Véase, por ejemplo,
Johnson et al. (1993). La base lógica que justifica el uso de peptidomiméticos es que la columna vertebral del
péptido de las proteínas existe principalmente para orientar las cadenas laterales de los aminoácidos, a fin de
40 facilitar interacciones moleculares, como las del anticuerpo y el antígeno. Se espera que un peptidomimético permita
interacciones moleculares similares a la molécula natural.

Las aplicaciones satisfactorias del concepto del peptidomimético se han concentrado por tanto en la mimética de los
giros beta de las proteínas, que se sabe que son altamente antigénicos. Del mismo modo, la estructura del giro beta
dentro de un polipéptido se puede predecir mediante algoritmos informatizados, tal como se debate en el presente
documento. Una vez que se determinan los aminoácidos componentes del giro, se pueden construir
45 peptidomiméticos para conseguir una orientación espacial similar de los elementos esenciales de las cadenas
laterales de los aminoácidos.

4.3 Preparación de anticuerpos específicos para las proteínas codificadas

50 4.3.1 Expresión de las proteínas de los cADN clonados

Las especies de cADN especificadas en las SEQ. ID. N° 1, SEQ. ID. N° 3 y SEQ. ID. N° 4 pueden expresarse como
proteínas o péptidos codificados. La ingeniería del segmento o los segmentos de ADN para la expresión en un
sistema procariótico o eucariótico se puede realizar mediante técnicas generalmente conocidas entre los expertos en
expresión recombinante. Se cree que se puede emplear prácticamente cualquier sistema de expresión en la
55 expresión de las secuencias de ácido nucleico reivindicadas.

- Tanto el cADN como las secuencias genómicas son apropiadas para la expresión eucariótica, dado que, por lo general, la célula hospedadora procesará las transcripciones genómicas para producir un mRNA funcional para la traslación a la proteína. Por otra parte, se pueden emplear secuencias parciales para la generación de anticuerpos contra porciones específicas de un producto genético, incluso cuando se siga desconociendo la secuencia completa de ese producto genético. Existen programas informáticos que ayudan a seleccionar las regiones que presentan una potencial importancia inmunológica. Por ejemplo, el software capaz de realizar este análisis se puede adquirir fácilmente en MacVector (IBI, New Haven, CT). El software emplea típicamente algoritmos estándar, como los métodos Kyte/Doolittle o Hopp/Woods, para ubicar secuencias hidrófilas que se encuentran característicamente en la superficie de las proteínas y que, por tanto, es probable que actúen como determinantes antigénicos.
- Para los fines del presente, se entenderá por células “modificadas” y “recombinantes” aquellas en las que un gen o segmento de ADN exógeno, como un gen o cADN, ha sido introducido artificialmente por el hombre. Por tanto, las células modificadas se pueden distinguir de las células naturalmente presentes que no contienen un gen o segmento de ADN exógeno introducido recombinantemente. Las células recombinantes incluyen aquellas que tienen un gen genómico o cADN introducido y también incluyen genes adyacentes a un promotor heterólogo no asociado naturalmente con el gen concreto introducido.
- Para expresar un péptido o proteína codificada recombinante, sea mutante o de tipo salvaje, se deberá preparar un vector de expresión que comprenda uno de los ácidos nucleicos aislados reivindicados, bajo el control de uno o más promotores u operativamente vinculados a éstos. Para poner una secuencia de codificación “bajo el control de un promotor”, por lo general se deberá posicionar el extremo 5' del sitio de iniciación de la transcripción del marco de lectura de la transcripción entre 1 y 50 nucleótidos “en sentido descendente” (es decir, 3') del promotor elegido. El promotor “en sentido ascendente” estimula la transcripción del ADN y promueve la expresión de la proteína recombinante codificada. Este es el significado de “expresión recombinante” en este contexto.
- Existen muchas técnicas estándar disponibles para construir vectores de expresión que contienen los ácidos nucleicos apropiados y secuencias de control de la transcripción/traslación, a fin de conseguir la expresión de la proteína o el péptido en diversos sistemas de expresión hospedadores. Los tipos de células disponibles para la expresión incluyen, a título meramente enunciativo, bacterias, como *E. coli* y *B. subtilis*, transformadas con vectores de expresión de ADN cósmido, ADN plásmido o ADN bacteriófago recombinante.
- Determinados ejemplos de hospedadores procarióticos son *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli*B, *E. coli* X 1776 (ATCC N° 31537), así como *E. coli* W3110 (F-, lambda-, prototrófico, ATCC N° 273325); bacilos como *Bacillus subtilis*; y otras enterobacteriáceas como la *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* y diversas especies de *Pseudomonas*.
- Por lo general, los vectores de plásmidos que contienen secuencias de control y replicación que se derivan de especies compatibles con la célula hospedadora se utilizan en relación con estos hospedadores. El vector contiene normalmente un sitio de replicación, así como secuencias de marcado que son capaces de proporcionar la selección fenotípica en las células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se suele transformar utilizando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes para la resistencia a la ampicilina y tetraciclina y, por tanto, proporciona un método sencillo para identificar las células transformadas. El plásmido pBR u otro fago o plásmido microbiano debe contener también —o ser modificado para que contenga— promotores que puedan ser utilizados por el organismo microbiano para la expresión de sus propias proteínas.
- Por otra parte, los vectores de fagos que contienen secuencias de control y replicación, compatibles con el microorganismo hospedador, pueden ser empleados como vectores de transformación en relación con estos hospedadores. Por ejemplo, el fago lambda GEM™-11 puede ser utilizado para producir un vector de fago recombinante, que se puede emplear para transformar células hospedadoras, tales como *E. coli* LE392.
- Otros vectores útiles incluyen los vectores pIN (Inouye *et al.*, 1985) y pGEX, que pueden ser empleados para generar proteínas de fusión solubles en glutatión S-transferasa (GST) para la posterior purificación y separación o clivaje. Otras proteínas de fusión adecuadas son las que contienen β -galactosidasa, ubiquitina o similares.
- Los promotores empleados más habitualmente en la construcción de ADN recombinante incluyen los sistemas promotores de triptófano (tip), lactosa y β -lactamasa (penicilinas). A pesar de que éstos son los más utilizados, se han descubierto y utilizado otros promotores microbianos, y se han publicado datos relativos a sus secuencias de nucleótidos, permitiendo a aquellos versados en la materia unirlos funcionalmente con vectores de plásmidos.
- Por ejemplo, para la expresión en *Saccharomyces*, habitualmente se emplea el plásmido YRp7 (Stinchcomb *et al.*, 1979; Kingsman *et al.*, 1979; Tschemper *et al.*, 1980). Este plásmido ya contiene el gen *trp1*, que proporciona un marcador de selección para una variedad mutante de la levadura que carece de capacidad para desarrollarse en triptófano, por ejemplo ATCC N° 44076 o PEP4-1 (Jones, 1977). La presencia de la lesión de *trp1* como una

característica del genoma de la célula hospedadora de levadura proporciona entonces un entorno efectivo para detectar la transformación por desarrollo en ausencia de triptófano.

Las secuencias promotoras adecuadas en los vectores de levadura incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman et al., 1980) u otras enzimas glicolíticas (Hess et al. 1968; Holland et al., 1978), tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa. Para construir plásmidos de expresión adecuados, las secuencias de terminación asociadas a estos genes también están ligadas al vector de expresión 3' de la secuencia que se desea expresar para conseguir la poliadenilación del mRNA y la terminación.

Otros promotores adecuados, que ofrecen la ventaja adicional de la transcripción controlada por las condiciones de desarrollo, incluyen la región promotora para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas con el metabolismo de nitrógeno y la mencionada gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, así como enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa.

Además de los microorganismos, también pueden emplearse como hospedadores los cultivos de células obtenidos de organismos multicelulares. En principio, cualquiera de estos cultivos celulares resulta viable, sea de cultivos de vertebrados o de invertebrados. Además de las células de mamíferos, éstos incluyen sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (p. ej., baculovirus); y sistemas de células de plantas infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (p. ej., el virus del mosaico de la coliflor (CaMV), el virus del mosaico del tabaco (TMV)) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (p. ej., el plásmido Ti) que contienen una o más secuencias de codificación.

En un sistema de insecto útil, se emplea el virus de la polihidrosis nuclear de la *Autographa californica* (AcNPV) como vector para expresar genes extraños. El virus se desarrolla en células de *Spodoptera frugiperda*. Las secuencias de codificación del ácido nucleico aislado son clonadas en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de polihedrina) del virus y puestas bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de polihedrina). La inserción con éxito de las secuencias de codificación resulta en la inactivación del gen de polihedrina y la producción de virus recombinantes no ocluidos (es decir, virus que carecen del revestimiento proteináceo codificado por el gen depolihedrina). Estos virus recombinantes se utilizan posteriormente para infectar las células de *Spodoptera frugiperda* en las que se expresa el gen insertado (p. ej., Patente estadounidense nº 4.215.051 (Smith)).

Algunos ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamífero son las células VERO y HeLa, las líneas de células de ovario de hámster chino (CHO), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN y MDCK. Por otra parte, se puede elegir una variedad de células hospedadoras que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifique y procese el producto del gen de la forma concreta deseada. Estas modificaciones (p. ej., Glicosilación) y procesamiento (p. ej., clivaje) de los productos de la proteína pueden ser importantes para la función de la proteína codificada.

Las diferentes células hospedadoras tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento postranslacional y la modificación de las proteínas. Se pueden elegir las líneas de células o los sistemas hospedadores apropiados para garantizar la modificación y el procesamiento correctos de la proteína extraña expresada. Los vectores de expresión para utilizar en células de mamífero normalmente incluyen un origen de replicación (cuando resulta necesario), un promotor ubicado delante del gen que se desea expresar, junto con cualquier sitio de unión de ribosomas, sitio de unión de RNA, sitio de poliadenilación y secuencias de terminación transcripcional necesarios. El origen de la replicación se puede proporcionar mediante la construcción del vector para que incluya un origen exógeno, como el que se puede obtener de SV40 u otra fuente viral (p.ej., polioma, adeno, VSV, BPV) o bien mediante el mecanismo de replicación cromosómica de la célula hospedadora. Si el vector está integrado en el cromosoma de la célula hospedadora, éste último suele ser suficiente.

Los promotores se pueden obtener del genoma de células de mamíferos (p. ej., el promotor de la metalotioneína) o de virus de mamíferos (p. ej., el promotor tardío de adenovirus, el promotor 7.5K del virus Vaccinia). Por otra parte, también resulta posible —y puede ser recomendable— utilizar promotores o secuencias de control normalmente asociados con la secuencia de genes deseada, siempre que estas secuencias de control sean compatibles con los sistemas de la célula hospedadora.

Se pueden utilizar diversos sistemas de expresión de base viral. Así, por ejemplo, los promotores habitualmente empleados se obtienen del polioma, adenovirus 2, y más frecuentemente el virus del simio 40 (SV40). Los promotores precoces y tardíos del virus SV40 resultan particularmente útiles, porque ambos se obtienen fácilmente de los virus como un fragmento que también contiene el origen de la replicación viral del SV40. Se pueden emplear

fragmentos de SV40 de menor o mayor tamaño, siempre que esté incluida la secuencia de unos 250 bp que se extiende desde el sitio Hind III hasta el sitio Bgl I ubicado en el origen de la replicación viral.

5 En los casos en los que se emplea un adenovirus como vector de expresión, las secuencias de codificación se pueden unir a un complejo de control de la transcripción/traslación del adenovirus, como el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico puede ser insertado a continuación en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (p. ej., región E1 o E3) resultará en un virus recombinante viable y capaz de expresar proteínas en los hospedadores infectados.

10 También pueden resultar necesarias señales de inicio específicas para una traslación eficiente de las secuencias que codifican el ácido nucleico aislado reivindicado. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes. También puede ser necesario proporcionar las señales de control de la traslación exógena, incluyendo el codón de inicio ATG. Aquella persona versada en la materia será capaz de determinar esto fácilmente y proporcionar las señales necesarias. Es bien sabido que el codón de inicio debe estar en marco (o en fase) con el marco de lectura de la secuencia de codificación deseada, para garantizar la traslación del elemento insertado completo. Estas señales de control de la traslación exógena y los codones de inicio pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de la expresión se puede mejorar mediante la inclusión de las secuencias de control de la transcripción o los terminadores transcripcionales apropiados (Bittner et al., 1987).

20 En la expresión eucariótica, típicamente también será deseable incorporar a la unidad de transcripción un sitio de poliadenilación apropiado (p. ej., 5'-AATAAA-3'), si el segmento clonado original no contenía uno. Típicamente, el sitio de adición de poli A se coloca unos 20 a 2000 nucleótidos "en sentido descendente" con respecto al sitio de terminación de la proteína en una posición anterior a la terminación de la transcripción.

25 Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes, es preferible la expresión estable. Por ejemplo, se pueden preparar líneas de células que expresan de forma estable estructuras que codifican proteínas. En lugar de utilizar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, las células hospedadoras pueden ser transformadas con vectores controlados mediante elementos de control de la expresión apropiados (p. ej., promotores, facilitadores, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.) y un marcador seleccionable. Tras la introducción de ADN extraño, se puede dejar que las células modificadas se desarrollen durante 1-2 días en un medio enriquecido para después cambiarlas a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crecer para formar focos que, a su vez, pueden ser clonados y expandidos en líneas de células.

35 Se pueden emplear diversos sistemas de selección, incluyendo, aunque sin limitación, la timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler et al., 1977), la hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (Szybalska et al., 1962) y genes de adenina fosforibosiltransferasa (Lowy et al., 1980), en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. Por otra parte, se puede emplear la resistencia a antimetabolitos como base para la selección de dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler et al., 1980; O'Hare et al., 1981); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan et al., 1981); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 (Colberre-Garapin et al., 1981); e hyg, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre et al., 1984).

40 Se contempla que los ácidos nucleicos aislados de la invención pueden estar "sobrexpresados", es decir expresados en niveles incrementados con respecto a su expresión natural en la próstata humana, las células o incluso con respecto a la expresión de otras proteínas en la célula hospedadora recombinante. Esta sobreexpresión se puede evaluar a través de diversos métodos, incluyendo el radioetiquetado y/o la purificación de proteína. No obstante, se prefieren los métodos sencillos y directos, como, por ejemplo, los que implican la SDS/PAGE y el teñido de proteínas o el inmunoensayo Western blot, seguido de análisis cuantitativos, como el estudio densitométrico del ensayo o gel resultante. Un incremento específico del nivel del péptido o la proteína recombinante en comparación con el nivel en las células de la próstata humana naturales es indicativo de sobreexpresión, como lo es una abundancia relativa de la proteína específica en relación con las demás proteínas producidas por la célula hospedadora, p. ej., visible en un gel.

4.3.2 Purificación de proteínas expresadas

50 Otros aspectos de la presente divulgación se refieren a la purificación y, en determinadas realizaciones, la purificación sustancial, de una proteína o péptido codificado. El término "proteína o péptido purificado" empleado en el presente se refiere a una composición, aislable de otros componentes, en la que la proteína o el péptido es purificado en cualquier grado con respecto a su estado naturalmente alcanzable, es decir, en este caso, con respecto a su pureza en el material extraído de una célula prostática. Por tanto, el término proteína o un péptido purificado se refiere también a una proteína o péptido libre del entorno en el que puede encontrarse naturalmente.

Por lo general, "purificado" se referirá a una composición peptídica o proteica que ha sido sometida a fraccionamiento para eliminar varios otros componentes y que conserva sustancialmente su actividad biológica expresada. Cuando se emplea el término "sustancialmente purificado", éste se referirá a una composición en la que la proteína o el péptido representa el componente principal de la composición, como alrededor del 50% o más de las proteínas de la composición.

A la luz de la presente divulgación, aquellos versados en la materia conocerán diversos métodos para cuantificar el grado de purificación de la proteína o el péptido. Éstos incluyen, por ejemplo, la determinación de la actividad específica de una fracción activa o la evaluación del número de polipéptidos en una fracción mediante un análisis SDS/PAGE. Un método preferible para la evaluación de la pureza de una fracción consiste en calcular la actividad específica de la fracción, para compararla con la actividad específica del material extraído inicial, y así calcular el grado de pureza, en el presente evaluado a través de "la cifra por la que se multiplica la purificación". Las unidades reales empleadas para representar la cantidad dependerán, por supuesto, de la técnica de ensayo concreta elegida para seguir la purificación y de si la proteína o el péptido expresado presenta o no una actividad detectable.

Aquellos versados en la materia conocerán diversas técnicas adecuadas para la purificación de proteínas. Estas incluyen, por ejemplo, la precipitación con sulfato de amonio, PEG, anticuerpos y similares o la desnaturalización por calor, seguida de centrifugación; los pasos cromatográficos como un intercambio de iones, la filtración en gel, la fase inversa, cromatografía con hidroxapatita y de afinidad; el enfoque isoelectrico; la electroforesis en gel; y las combinaciones de estas y otras técnicas. Como ya se conoce generalmente en el campo, se cree que el orden de realización de los diversos pasos de purificación se puede modificar, o que determinados pasos se pueden omitir, resultando, no obstante, un método adecuado para la preparación de una proteína o un péptido sustancialmente purificado.

En general, no es necesario que la proteína o el péptido se proporcionen siempre en el estado de purificación máxima. En efecto, se contempla que los productos purificados de manera menos sustancial resultarán útiles en determinadas realizaciones. La purificación parcial se puede realizar empleando menos pasos de purificación en combinación o bien empleando diferentes formas del mismo régimen de purificación general. Por ejemplo, se aprecia que, por lo general, una cromatografía en columna de intercambio de cationes realizada utilizando un aparato de HPLC resultará en una cifra de multiplicación de la purificación mayor que con la misma técnica empleando un sistema de cromatografía de baja presión. Los métodos que exhiben un menor grado de purificación relativa pueden ofrecer ventajas en la recuperación total del producto proteico o en el mantenimiento de la actividad de una proteína expresada.

Se sabe que la migración de un polipéptido puede variar, en ocasiones de forma significativa, con diferentes condiciones de la SDS/PAGE (Capaldi et al., 1977). Por tanto, se apreciará que "en diferentes condiciones de electroforesis, los pesos moleculares aparentes de los productos de expresión purificados o parcialmente purificados pueden variar".

4.3.3 Generación de anticuerpos

Para algunas realizaciones, resultará recomendable producir anticuerpos que se unan con gran especificidad al producto o los productos polipeptídicos de un ácido nucleico aislado seleccionado de las SEQ. ID. Nº 1, SEQ. ID. Nº 3 y SEQ. ID. Nº 4. Los medios para la preparación y caracterización de anticuerpos son bien conocidos en el campo (véase, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

Los métodos para generar anticuerpos policlonales son bien conocidos en el campo. Dicho brevemente, un anticuerpo policlonal se prepara inmunizando a un animal con una composición inmunogénica y recogiendo antisuero de ese animal inmunizado. Se pueden utilizar diversas especies de animales para la producción de antisueros. Típicamente, el animal empleado para la producción de antisueros es un conejo, un ratón, una rata, un hámster, una cobaya o una cabra. Debido al volumen de sangre relativamente grande de los conejos, el conejo es la elección preferible para la producción de anticuerpos policlonales.

Como se conoce bien en el campo, la inmunogenicidad de una composición dada puede variar. Por tanto, a menudo es necesario estimular el sistema inmunológico del hospedador, lo que se puede conseguir uniendo un péptido o polipéptido del inmunogen a un vehículo. Algunos ejemplos de vehículos preferibles son la hemocianina de la lapa californiana (KLH) y la albúmina sérica bovina (BSA). Otras albúminas, como la ovalbúmina, la albúmina sérica de ratón o la albúmina sérica de conejo, también pueden ser empleadas como vehículos. Los medios para conjugar un polipéptido con una proteína vehicular son bien conocidos en el campo e incluyen glutaraldehído, éster de m-maleimidobenzoyl-N-hidroxisuccinimida, carbodiimida y bencidina bis-biazotizada.

- 5 Como también se conoce bien en el campo, la inmunogenicidad de una determinada composición inmunogenética se puede intensificar a través del uso de estimuladores no específicos de la respuesta inmunológica, conocidos como adyuvantes. Algunos ejemplos de adyuvantes preferibles incluyen el adyuvante completo de Freund (un estimulador no específico de la respuesta inmunológica que contiene *Mycobacterium tuberculosis* muerto), adyuvantes incompletos de Freund y adyuvante de hidróxido de aluminio.
- 10 La cantidad de composición inmunogenética empleada en la producción de anticuerpos policlonales varía dependiendo de la naturaleza del inmunogen, así como del animal empleado para la inmunización. Se pueden emplear diversas vías para administrar el inmunogen (subcutánea, intramuscular, intradérmica, intravenosa e intraperitoneal). La producción de anticuerpos policlonales se puede controlar tomando una muestra de sangre del animal inmunizado en diferentes momentos tras la inmunización. También se puede administrar una segunda inyección de refuerzo. El proceso de refuerzo y titulación se repite hasta que se alcanza un título adecuado. Cuando se ha alcanzado un nivel de inmunogenicidad deseado, el animal inmunizado puede ser desangrado para aislar y almacenar el suero. El animal también puede ser empleado para generar MABs. Para la producción de anticuerpos policlonales de conejo, el animal puede ser desangrado a través de una vena de la oreja o, alternativamente, mediante punción cardíaca. La sangre extraída se deja coagular y posteriormente se centrifuga para separar los componentes del suero de las células completas y los coágulos de sangre. El suero se puede emplear tal cual para diversas aplicaciones. También se puede purificar la fracción del anticuerpo deseada mediante métodos bien conocidos, como la cromatografía de afinidad, empleando otro anticuerpo o un péptido unido a una matriz sólida.
- 15 Los anticuerpos monoclonales (MABs) se pueden preparar fácilmente empleando técnicas bien conocidas, como las ejemplificadas en la Patente estadounidense nº 4.196.265. Típicamente, esta técnica implica la inmunización de un animal adecuado con una composición inmunogenética seleccionada, como una proteína, un péptido o un polipéptido expresado purificado o parcialmente purificado. La composición de inmunización se administra de manera efectiva para estimular las células que producen los anticuerpos.
- 20 Por lo general, los métodos para generar anticuerpos monoclonales (MABs) comienzan en los mismos términos que los empleados para preparar anticuerpos policlonales. Los roedores, como el ratón y la rata, son los animales preferibles. No obstante, también resulta posible emplear células de conejo, de oveja o de rana. El uso de ratas puede ofrecer determinadas ventajas (Goding, 1986, pp. 60-61), aunque son preferibles los ratones, en concreto el ratón BALB/c, que es el que se emplea rutinariamente y por lo general permite un porcentaje de fusiones estables superior.
- 25 Se inyecta el antígeno a los animales como se ha descrito anteriormente. El antígeno puede estar unido a moléculas vehiculares, como la hemocianina de la lapa californiana, si es necesario. Típicamente, el antígeno se mezclará con adyuvante, como el adyuvante completo o incompleto de Freund. Las inyecciones de refuerzo con el mismo antígeno se aplicarían aproximadamente a intervalos de dos semanas.
- 30 Después de la inmunización, las células somáticas con potencial para producir anticuerpos, específicamente linfocitos B (células B), son seleccionadas para emplearlas en el protocolo de generación de MAB. Estas células se pueden obtener de las biopsias de bazo, amígdalas o nódulos linfáticos, así como de una muestra de sangre periférica. Son preferibles las células del bazo y las células de la sangre periférica: las primeras porque son una fuente rica en células productoras de anticuerpos que se encuentran en la fase de división de plasmablastos y las segundas porque resulta sencillo acceder a la sangre periférica. A menudo se inmunizará a un grupo de animales y se extirpará el bazo del animal con la titulación de anticuerpos más elevada para obtener los linfocitos del bazo mediante la homogeneización del bazo con una jeringa. Típicamente, un bazo de un ratón inmunizado contiene aproximadamente entre 5×10^7 y 2×10^8 linfocitos.
- 35 Los linfocitos B que producen anticuerpos procedentes del animal inmunizado se fusionan a continuación con células de una célula inmortal de mieloma (por lo general una de la misma especie que el animal inmunizado). Las líneas de células de mieloma adecuadas para la utilización en procedimientos de fusión productores de hibridoma son preferiblemente las que no producen anticuerpos, presentan una elevada eficiencia de fusión y deficiencias enzimáticas que hacen que sean incapaces de desarrollarse en determinados medios selectivos que potencian el crecimiento solamente de las células fusionadas deseadas (hibridomas).
- 40 Se puede emplear cualquier número de células de mieloma, tal como saben aquellos versados en la materia (Goding, pp. 65-66, 1986; Campbell, pp. 75-83, 1984). Por ejemplo, cuando el animal inmunizado es un ratón, se puede emplear P3-X63/Ag8, X63-Ag8.653, NSI/I.Ag 4 1, Sp210-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 y S194/5XX0 Bui; en el caso de las ratas, se puede emplear R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F y 4B210; y U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 y UC729-6 resultan útiles en relación con las fusiones de células humanas.
- 45 Una célula de mieloma murino preferible es la línea de células de mieloma NS-1 (también denominada P3-NS-I-Ag4-I), que se puede obtener fácilmente en el Depósito de Células Mutantes Genéticas Humanas del NIGMS, solicitando
- 50
- 55

el número de depósito de la línea de células GM3573. Otra línea de células de mieloma de ratón que se puede emplear es la línea de células de mieloma de ratón resistente a la 8-azaguanina y no productora de SP2/0.

Por lo general, los métodos para generar híbridos de células de nódulos linfáticos o de bazo que producen anticuerpos y células de mieloma comprenden la combinación de células somáticas con células de mieloma en una proporción de 2:1, aunque la proporción puede variar de entre 20:1 a 1:1, respectivamente, en presencia de un agente o agentes (químicos o eléctricos) que fomentan la fusión de las membranas celulares. Los métodos de fusión que emplean virus Sendai han sido descritos por Kohler y Milstein (1975; 1976), y los que emplean glicol de polietileno (PEG), como un 37% (v/v) de PEG, por Geffer *et al.* (1977). El uso de métodos de fusión inducidos eléctricamente también resulta apropiado (Goding pp. 71 -74, 1986).

Habitualmente, los procedimientos de fusión producen híbridos viables a bajas frecuencias, de unos 1×10^{-6} a 1×10^{-8} . No obstante, esto no supone un problema, dado que los híbridos fusionados viables se diferencian de las células parenterales no fusionadas (en particular, las células de mieloma no fusionadas que normalmente continuarían dividiéndose de forma indefinida) mediante cultivo en un medio selectivo. Por lo general, el medio selectivo es uno que contiene un agente que bloquea la síntesis *de novo* de los nucleótidos en el medio de cultivo del tejido. Algunos ejemplos de agentes preferibles son la aminopterina, el metotrexato y la azaserina. La aminopterina y el metotrexato bloquean la síntesis *de novo* de purinas y pirimidinas, mientras que la azaserina solamente bloquea la síntesis de purinas. Cuando se emplea aminopterina o metotrexato, el medio se suplementa con hipoxantina y timidina como fuente de nucleótidos (medio HAT). Cuando se emplea azaserina, el medio se suplementa con hipoxantina.

El medio de selección preferible es HAT. Solamente las células capaces de operar vías de salvamento de nucleótidos son capaces de sobrevivir en el medio HAT. Las células de mieloma carecen de enzimas clave de la vía de salvamento, como la hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HPRT), y no pueden sobrevivir. Las células B pueden operar esta vía, aunque tienen un ciclo de vida limitado en cultivo y, por lo general, mueren en el plazo de unas dos semanas. Por tanto, las únicas células que pueden sobrevivir en el medio selectivo son aquellos híbridos formados a partir de mieloma y células B.

Este cultivo proporciona una población de hibridomas de los que se seleccionan hibridomas específicos. Típicamente, la selección de hibridomas se realiza cultivando las células mediante dilución de un único clon en placas de microtitulación, seguida de análisis de los supernatantes clonales individuales (una vez transcurridas dos o tres semanas) para detectar la reactividad deseada. El análisis deberá ser sensible, sencillo y rápido, como los radioinmunoensayos, inmunoensayos enzimáticos, ensayos de citotoxicidad, ensayos de placa, ensayos de inmunodetección dot blot y similares.

Los hibridomas seleccionados serán después diluidos en serie y clonados en líneas de células individuales productoras de anticuerpos, y los clones podrán ser posteriormente propagados indefinidamente para proporcionar MABs. Las líneas de células podrán ser explotadas para la producción de MAb, básicamente de dos formas. Se podrá inyectar una muestra del hibridoma (normalmente en la cavidad peritoneal) de un animal histocompatible con el tipo empleado para proporcionar las células somáticas y de mieloma para la fusión original. El animal inyectado desarrolla tumores que secretan el anticuerpo monoclonal específico producido por el híbrido de las células fusionadas. Los fluidos corporales del animal, como el suero o el líquido ascítico, pueden ser posteriormente explotados para obtener MABs en una concentración elevada. Las líneas de células individuales también pueden ser cultivadas *in vitro*, donde los MABs son naturalmente secretados en el medio de cultivo del que se pueden obtener fácilmente en concentraciones elevadas. Los MABs producidos por cualquier medio también pueden ser purificados, si se desea, empleando métodos de filtrado, centrifugado y diversos métodos cromatográficos, como la HPLC o la cromatografía de afinidad.

Se pueden obtener grandes cantidades de los anticuerpos monoclonales de la presente divulgación multiplicando los hibridomas *in vivo*. Los clones de las células son inyectados en mamíferos histocompatibles con las células madre, por ejemplos, ratones singénicos, para conseguir el crecimiento de los tumores que producen anticuerpos. Opcionalmente, a los animales se les aplica un hidrocarburo, especialmente aceites como pristano (tetrametilpentadecano), antes de la inyección.

De acuerdo con la presente divulgación, se pueden obtener fragmentos del anticuerpo monoclonal de la divulgación a partir del anticuerpo monoclonal producido como se ha descrito anteriormente, a través de métodos que incluyen la digestión con enzimas, como pepsina o papaína, y/o el clivaje de enlaces de disulfuro mediante reducción química. Alternativamente, se pueden sintetizar los fragmentos del anticuerpo monoclonal abarcados por la presente divulgación empleando un sintetizador de péptidos automático.

Los conjugados monoclonales de la presente divulgación se preparan con métodos conocidos en el campo, p. ej., haciendo reaccionar un anticuerpo monoclonal preparado como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, con una enzima en presencia de un agente de acoplamiento como glutaraldehído o periodato. Los conjugados con

marcadores de fluoresceína se preparan en presencia de estos agentes de acoplamiento o mediante reacción con isotiocianato. Los conjugados con quelatos metálicos se producen de forma similar. Otras fracciones con las que se pueden conjugar los anticuerpos incluyen radionúclidos como ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , ^{51}Cr , ^{36}Cl , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{152}Eu , and $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Los anticuerpos monoclonales etiquetados radioactivamente de la presente divulgación se producen de acuerdo con métodos bien conocidos en el campo. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales pueden ser yodados por contacto con yoduro de sodio o potasio y un agente químico oxidante, como hipoclorito de sodio, o un agente enzimático oxidante, como lactoperoxidasa. Los anticuerpos monoclonales de acuerdo con la divulgación pueden ser etiquetados con 99 tecnecio mediante un proceso de intercambio de ligandos, por ejemplo reduciendo el pertecnetato con solución estannosa, quelando el tecnecio reducido sobre una columna Sephadex y aplicando el anticuerpo a esta columna o mediante técnicas de etiquetado directo, p. ej., incubando pertecnetato, un agente reductor como SnCl_2 , una solución tampón como una solución de ftalato de sodio-potasio, y el anticuerpo.

Aquellos versados en la materia apreciarán que los anticuerpos monoclonales o policlonales específicos para las proteínas que se expresan preferencialmente en el cáncer de próstata humano metastásico o no metastásico resultarán útiles en diversos tipos de aplicaciones. Estas pueden incluir la producción de kits de diagnóstico para la detección o el diagnóstico del cáncer de próstata humano. Un uso alternativo consistiría en unir estos anticuerpos a agentes terapéuticos, como agentes quimioterapéuticos, administrárselos a individuos con cáncer de próstata, y de este modo dirigirlos de forma selectiva a las células cancerígenas prostáticas para su destrucción. Las personas cualificadas en el campo apreciarán que estos usos se encuentran dentro del ámbito de aplicación de la presente divulgación.

4.4 Ensayos de inmunodetección

4.4.1 Métodos de inmunodetección

En otras realizaciones adicionales, la presente divulgación se refiere a métodos de inmunodetección para la unión, purificación, eliminación, cuantificación o detección en general de componentes biológicos. Las proteínas o péptidos codificados de la presente divulgación se pueden emplear para detectar anticuerpos que presentan reactividad a los mismos o, alternativamente, los anticuerpos preparados de conformidad con la presente divulgación pueden ser empleados para detectar proteínas o péptidos codificados. La bibliografía científica ha descrito los pasos de diversos métodos de inmunodetección útiles, tales como Nakamura *et al.* (1987).

En general, los métodos de inmunodetección incluyen la obtención de una muestra sospechosa de contener una proteína, un péptido o anticuerpo, y el contacto de la muestra con un anticuerpo o proteína o péptido de acuerdo con la presente divulgación, según corresponda, en condiciones efectivas para permitir la formación de inmunocomplejos.

Los métodos de inmunodetección incluyen métodos para detectar o cuantificar la cantidad de un componente reactivo en una muestra, métodos que exigen la detección o cuantificación de cualquier inmunocomplejo formado durante el proceso de enlace. Aquí, se obtendría una muestra sospechosa de contener un péptido, una proteína específica de la próstata o el correspondiente anticuerpo y se pondría en contacto la muestra con un anticuerpo o una proteína o péptido codificado, según correspondiente, para después detectar o cuantificar la cantidad de inmunocomplejos formados bajo las condiciones específicas.

En términos de detección de antígenos, la muestra biológica analizada puede ser cualquier muestra sospechosa de contener un antígeno específico del cáncer de próstata, como una muestra o sección de tejido de los nódulos linfáticos o prostáticos, un extracto de tejido homogeneizado, una célula aislada, una preparación de membrana celular, formas purificadas o separadas de cualquiera de las anteriores composiciones que contienen proteínas, o incluso cualquier fluido biológico que esté en contacto con tejidos prostáticos, incluyendo la sangre o el líquido linfático.

Por lo general, para poner en contacto la muestra biológica elegida con la proteína, el péptido o el anticuerpo en condiciones efectivas y durante un período de tiempo suficiente como para permitir la formación de inmunocomplejos (inmunocomplejos primarios) basta con añadir la composición a la muestra e incubar la muestra durante un período de tiempo suficientemente prolongado como para que los anticuerpos formen inmunocomplejos con cualquier antígeno presente (es decir, para unirse a ellos). Transcurrido este tiempo, por lo general se lavará la composición muestra-anticuerpo, como una sección de tejido, placa ELISA, inmunoensayo Western blot o dot blot, para eliminar cualquier especie de anticuerpo unida no específicamente, permitiendo que se detecten solamente aquellos anticuerpos unidos específicamente dentro de los inmunocomplejos primarios.

Por lo general, la detección de la formación de inmunocomplejos es bien conocida en el campo y se puede conseguir mediante la aplicación de numerosos enfoques. Estos métodos se basan generalmente en la detección de

una etiqueta o marcador, como cualquier etiqueta o marcador radiactivo, fluorescente, biológico o enzimático de uso estándar en el campo. Las Patentes estadounidenses relativas al uso de estas etiquetas incluyen 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 y 4.366.241. Por supuesto, se pueden encontrar ventajas adicionales en el uso de un ligando de unión secundario, como una disposición de unión del ligando de biotina/avidina o un segundo anticuerpo, tal y como se conoce en el campo.

La proteína, el péptido codificado o el anticuerpo correspondiente empleado en la detección puede unirse por sí mismo a una etiqueta detectable, donde bastaría con detectar esta etiqueta, permitiendo así determinar la cantidad de inmunocomplejos primarios en la composición.

Alternativamente, el primer componente añadido que se une dentro de los inmunocomplejos primarios se puede detectar mediante un segundo ligando de unión que tiene una afinidad de unión con la proteína, el péptido codificado o el anticuerpo correspondiente. En estos casos, el segundo ligando de unión puede unirse a una etiqueta detectable. El segundo ligando de unión suele ser un anticuerpo, que por tanto se puede denominar anticuerpo "secundario". Los inmunocomplejos primarios se ponen en contacto con el anticuerpo o ligando de unión secundario etiquetado, en condiciones efectivas y durante un período de tiempo suficiente como para permitir la formación de inmunocomplejos secundarios. Por lo general, a continuación los inmunocomplejos secundarios se lavan para eliminar cualquier ligando o anticuerpo secundario etiquetado unido de forma no específica, y se detecta la etiqueta que queda en los inmunocomplejos secundarios.

Otros métodos incluyen la detección de inmunocomplejos primarios mediante un planteamiento en dos pasos. Un segundo ligando de unión, como un anticuerpo, que tiene afinidad de unión con la proteína, el péptido codificado o el anticuerpo correspondiente, se emplea para formar inmunocomplejos secundarios, tal y como se ha descrito anteriormente. Después del lavado, los inmunocomplejos secundarios se ponen en contacto con un tercer anticuerpo o ligando de unión que presenta una afinidad de unión con el segundo anticuerpo, una vez más en condiciones efectivas y durante un período de tiempo suficiente como para permitir la formación de inmunocomplejos (inmunocomplejos terciarios). El tercer ligando o anticuerpo se une a una etiqueta detectable, permitiendo la detección de los inmunocomplejos terciarios así formados. Este sistema puede proporcionar una amplificación de la señal, si se desea.

Los métodos de inmunodetección de la presente divulgación tienen una utilidad evidente para el diagnóstico de condiciones como el cáncer de próstata. Aquí se emplea una muestra biológica o clínica sospechosa de contener la proteína o el péptido codificado o el correspondiente anticuerpo. No obstante, estas realizaciones también tienen aplicaciones para muestras no clínicas, como en la titulación de muestras de antígeno o anticuerpo, en la selección de hibridomas y similares.

En el diagnóstico clínico o el control de pacientes con cáncer de próstata, la detección de un antígeno codificado por un ácido nucleico correspondiente a las SEQ. ID. N° 1, SEQ. ID. N° 3 o SEQ. ID. N° 4, o un incremento en los niveles de este antígeno, en comparación con los niveles de una muestra biológica correspondiente de un sujeto normal, es indicativo de un paciente con cáncer de próstata. La base para estos métodos de diagnóstico reside, en parte, en la conclusión de que el nuevo gen específico de la próstata identificado en la presente invención está sobreexpresado en las muestras de tejido del cáncer de próstata (véanse los Ejemplos, más abajo). Por extensión, se puede deducir que el mencionado gen produce unos niveles elevados de la proteína o proteínas codificadas que se pueden emplear como marcadores del cáncer de próstata.

Aquellos versados en la materia están muy familiarizados con la diferenciación entre la expresión significativa de un gen específico de la próstata, que representa una identificación positiva, y una expresión de bajo nivel o de fondo del mismo gen. De hecho, los niveles de expresión de fondo se utilizan habitualmente para determinar un "corte", por encima del cual el aumento de la tinción se considerará significativo o positivo. La expresión significativa se puede representar mediante elevados niveles de antígenos en los tejidos o en los fluidos corporales o, alternativamente, por una elevada proporción de células del interior de un tejido que emiten una señal positiva.

4.4.2. Inmunohistoquímica

Los anticuerpos de la presente divulgación se pueden emplear conjuntamente con bloques de tejido colocados en parafina, fijados con formalina y congelados, preparados mediante inmunohistoquímica (IHC). Se puede emplear cualquier método de IHC conocido en el campo, como los descritos en *Diagnostic Immunopathology*, 2ª edición, editado por Robert B. Colvin, Atul K. Bhan y Robert T. McCluskey. Raven Press, New York., 1995, y en particular en el Capítulo 31 de la referencia titulada *Gynecological and Genitourinary Tumors* (páginas 579-597), de Debra A. Bell, Robert H. Young y Robert E. Scully, así como en las referencias incluidas en el mismo.

4.4.3 ELISA

5 Como se ha señalado, se contempla que las proteínas o los péptidos codificados de la divulgación tendrán utilidad como inmunógenos, por ejemplo, en relación con el desarrollo de vacunas, en inmunohistoquímica y en ensayos ELISA. Una utilidad evidente de los antígenos codificados y los anticuerpos correspondientes es en inmunoensayos para la detección de proteínas específicas del cáncer de próstata, necesaria para el diagnóstico y el control del pronóstico.

10 Los inmunoensayos, en su forma más sencilla y directa, son ensayos de unión. Determinados inmunoensayos preferibles son los diversos tipos de ensayos de inmunoabsorción enzimática (ELISA) y radioinmunoensayos (RIA) conocidos en el campo. La detección inmunohistoquímica empleando secciones de tejido también resulta particularmente útil. No obstante, se apreciará fácilmente que la detección no se limita a estas técnicas y que también se pueden emplear inmunoensayos Western blot, dot blot, análisis FACS y similares.

15 En un ejemplo de ELISA, los anticuerpos que se unen a las proteínas codificadas de la divulgación son inmovilizados en una superficie seleccionada que presenta afinidad por la proteína, como un pocillo de una placa de microtitulación de poliestireno. Entonces, se añade a los pocillos una composición de ensayo sospechosa de contener el antígeno marcador del cáncer de próstata, como una muestra clínica. Después de la unión y del lavado para eliminar los inmunocomplejos unidos de forma no específica, se puede detectar el antígeno unido. Por lo general, la detección se consigue añadiendo un segundo anticuerpo específico para la proteína diana, que está unido a una etiqueta detectable. Este tipo de ELISA es un "ELISA de fase doble" sencillo. La detección también se puede conseguir mediante la adición de un segundo anticuerpo, seguida de la adición de un tercer anticuerpo que presenta afinidad de unión por el segundo anticuerpo, estando el tercer anticuerpo unido a una etiqueta detectable.

20 En otro ejemplo de ELISA, las muestras sospechosas de contener el antígeno marcador del cáncer de próstata son inmovilizadas en la superficie del pocillo para después ponerlas en contacto con los anticuerpos de la invención. Después de la unión y el lavado para eliminar los inmunocomplejos unidos de forma no específica, se detecta el antígeno unido. Cuando los anticuerpos iniciales están unidos a una etiqueta detectable, es posible detectar los inmunocomplejos directamente. Una vez más, los inmunocomplejos pueden ser detectados empleando un segundo anticuerpo que presenta afinidad de unión por el primer anticuerpo, estando el segundo anticuerpo unido a una etiqueta detectable.

25 Otro ELISA en el que las proteínas o los péptidos son inmovilizados implica el uso de competencia de anticuerpos en la detección. En este ELISA, se añaden anticuerpos etiquetados a los pocillos, se deja que se unan a la proteína marcadora del cáncer de próstata, y se detectan a través de su etiqueta. La cantidad de antígeno marcador en una muestra desconocida se determina entonces mezclando la muestra con los anticuerpos etiquetados, antes o durante la incubación con pocillos recubiertos. La presencia de antígeno marcador en la muestra actúa para reducir la cantidad de anticuerpo disponible para la unión al pocillo y, de este modo, reduce la señal final. Esto resulta apropiado para detectar anticuerpos en una muestra desconocida, donde los anticuerpos etiquetados se unen a los pocillos recubiertos con antígeno y también se reduce la cantidad de antígeno disponible para unirse a los anticuerpos etiquetados.

Independientemente del formato empleado, los ELISA presentan ciertas características en común, como el revestimiento, la incubación o unión, el lavado para eliminar las especies de unión no específica y la detección de inmunocomplejos unidos. Estos se describen como sigue:

30 Al revestir una placa con antígeno o anticuerpo, por lo general se incubarán los pocillos de la placa con una solución del antígeno o anticuerpo, bien hasta el día siguiente o durante un período de varias horas especificado. Los pocillos de la placa se lavarán entonces para eliminar el material que no se haya adsorbido por completo. Entonces se "revestirán" todas las superficies restantes disponibles de los pocillos con una proteína no específica que sea antigénicamente neutra con respecto a los antisueros del ensayo. Estas incluyen albúmina sérica bovina (BSA), caseína y soluciones de leche en polvo. El revestimiento permite bloquear los sitios de adsorción no específicos sobre la superficie de inmovilización y de este modo se reduce el fondo causado por la unión no específica de antisueros sobre la superficie.

35 En los ELISA, probablemente se acostumbra a emplear un medio de detección secundario o terciario en lugar de un procedimiento directo. Así, tras la unión de una proteína o anticuerpo al pocillo, el revestimiento con un material no reactivo para reducir el fondo y el lavado para eliminar el material no unido, la superficie de inmovilización se pone en contacto con la próstata humana de control, el cáncer y/o la muestra clínica o biológica que se pretende testar en condiciones efectivas para permitir la formación de inmunocomplejo (antígeno/anticuerpo). La detección del inmunocomplejo precisa después de un anticuerpo o ligando de unión secundario etiquetado, o de un anticuerpo o ligando de unión secundario conjuntamente con un anticuerpo terciario etiquetado, o un tercer ligando de unión.

"En condiciones efectivas para permitir la formación de inmunocomplejo (antígeno/anticuerpo)" significa que las condiciones preferibles incluyen la dilución de antígenos y anticuerpos con soluciones como BSA, gammaglobulina bovina (BGG) y solución tampón de fosfatos (PBS)/Tween. Estos agentes añadidos también tienden a contribuir a la reducción del fondo no específico.

5 Las condiciones "adecuadas" también significa que la incubación se produce a una temperatura y durante un período de tiempo suficientes como para permitir la unión efectiva. Los pasos de incubación se prolongan típicamente de 1 o 2 a 4 horas, a temperaturas preferiblemente del orden de los 25°C a 27°C, o de un día para otro a unos 4°C aproximadamente.

10 Tras todos los pasos de incubación en un ELISA, la superficie en contacto se lava, a fin de eliminar el material no incluido en el complejo. Un procedimiento de lavado preferible incluye el lavado con una solución como PBS/Tween o tampón de borato. Tras la formación de inmunocomplejos específicos entre la muestra de ensayo y el material unido originalmente, y el posterior lavado, se puede determinar la aparición de cantidades incluso mínimas de inmunocomplejos.

15 Para proporcionar un medio de detección, el segundo o tercer anticuerpo tendrá una etiqueta asociada a fin de permitir la detección. Preferiblemente, se tratará de una enzima que generará el desarrollo de un color tras la incubación con un sustrato cromogénico apropiado. Así, por ejemplo, resultará deseable poner en contacto e incubar el primer o el segundo inmunocomplejo con una ureasa, oxidasa de glucosa, fosfatasa alcalina o anticuerpo conjugado con peroxidasa de hidrógeno, durante un período de tiempo y en unas condiciones que favorezcan el desarrollo de la formación de inmunocomplejo (p. ej., incubación durante dos horas a temperatura ambiente en una solución que contenga PBS, como PBS/Tween).

20 Tras la incubación con el anticuerpo etiquetado y el posterior lavado para eliminar el material no unido, se cuantifica la cantidad de etiqueta, p. ej., mediante incubación con un sustrato cromogénico como urea y púrpura de bromocresol o ácido 2,2'-azido-di-(3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico [ABTS] y H₂O₂, en el caso de la peroxidasa como etiqueta de la enzima. La cuantificación se consigue entonces midiendo el grado de generación de color, p. ej., empleando un espectrofotómetro de espectros visibles.

25 4.4.4 Uso de anticuerpos para las radioimágenes

Los anticuerpos de la presente divulgación se emplearán para cuantificar y localizar la expresión de las proteínas marcadoras codificadas. El anticuerpo, por ejemplo, será etiquetado por cualquiera de los diversos métodos disponibles y se empleará para visualizar la concentración localizada de las células que producen la proteína codificada.

30 La divulgación también se refiere a un método *in vivo* de captación de imágenes de un estado patológico de cáncer de próstata, empleando los anticuerpos monoclonales anteriormente descritos. Concretamente, este método implica la administración a un sujeto de una cantidad, efectiva para la captación de imágenes, de un anticuerpo monoclonal específico del cáncer de próstata y etiquetado de forma que resulte detectable, o un fragmento del mismo, junto con un vehículo farmacéuticamente efectivo, y la posterior detección de la unión del anticuerpo monoclonal etiquetado con el tejido enfermo. El término "captación de imágenes *in vivo*" se refiere a cualquier método que permita la detección de un anticuerpo monoclonal etiquetado de la presente invención, o de un fragmento del mismo, que se una específicamente a un tejido enfermo localizado en el cuerpo del sujeto. Un "sujeto" es un mamífero, preferiblemente un ser humano. Una "cantidad efectiva para la captación de imágenes" significa que la cantidad administrada del anticuerpo monoclonal etiquetado de forma que resulte detectable, o un fragmento del mismo, resulta suficiente como para permitir la detección de la unión del anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo al tejido enfermo.

40 Un factor a tener en cuenta a la hora de seleccionar un radionúclido para el diagnóstico *in vivo* es que la vida media de un nucleido ha de ser lo suficientemente prolongada como para que continúe siendo detectable en el momento de la absorción máxima por parte de la diana, aunque lo suficientemente breve como para minimizar la radiación nociva sobre el huésped, así como el fondo. Idealmente, un radionúclido empleado para la captación de imágenes *in vivo* no presentará una emisión de partículas, aunque producirá un gran número de protones en un rango de 140-2000 keV, que se podrán detectar fácilmente mediante cámaras gamma convencionales.

45 Un radionúclido puede unirse a un anticuerpo directa o indirectamente, empleando un grupo funcional intermediario. Los grupos funcionales intermediarios que se emplean habitualmente para unir radioisótopos existentes, como iones metálicos, al anticuerpo son el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y el ácido etilendiaminotetracético (EDTA).

Algunos ejemplos de iones metálicos adecuados para ser empleados en la presente invención son ^{99m}Tc , ^{123}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{131}I , ^{97}Ru , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{125}I , ^{68}Ga , ^{72}As , ^{89}Zr , y ^{201}Tl .

De acuerdo con la presente divulgación, el anticuerpo monoclonal o fragmento del mismo puede ser etiquetado a través de varias técnicas conocidas en el campo. Los métodos de la presente divulgación también pueden emplear isótopos paramagnéticos para los fines de la detección *in vivo*. Algunos elementos particularmente útiles en la captación de imágenes por resonancia magnética (MRI) incluyen ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{162}Dy , ^{52}Cr , y ^{56}Fe .

La administración del anticuerpo etiquetado puede ser local o sistémica y realizarse por vía intravenosa, intraarterial, a través del fluido espinal o similar. La administración también puede ser intradérmica o intracavitaria, dependiendo de la parte del cuerpo que se vaya a examinar. Una vez transcurrido el tiempo suficiente para que el anticuerpo monoclonal o el fragmento del mismo se una con el tejido enfermo (por ejemplo, entre 30 minutos y 48 horas), la zona del sujeto que se desea investigar se somete a examen a través de técnicas rutinarias para la captación de imágenes, tales como MRI, SPECT, captación de imágenes por centelleo planar y otras técnicas emergentes. El protocolo concreto variará necesariamente dependiendo de factores específicos del paciente, como se ha señalado anteriormente, y también de la parte del cuerpo que se vaya a examinar, del método de administración y del tipo de etiqueta utilizado. La determinación de los procedimientos específicos será una tarea rutinaria para aquellos versados en la materia. Posteriormente, se controla y registra la distribución del isótopo radiactivo unido y su incremento o disminución con el tiempo. Al comparar los resultados con los datos obtenidos de los estudios de individuos clínicamente normales, se podrá determinar la presencia y la cantidad de tejido enfermo.

Aquellos versados en la materia apreciarán fácilmente que se puede emplear un planteamiento similar para capturar imágenes radiológicas de la producción de proteínas marcadoras codificadas del cáncer de próstata en pacientes humanos. La presente divulgación proporciona métodos para el diagnóstico *in vivo* del cáncer de próstata en un paciente. Por lo general, estos métodos comprenden la administración a un paciente de una cantidad efectiva de un anticuerpo específico del cáncer de próstata, conjugado con un marcador, como un isótopo radiactivo o una molécula con marcado de espín, que se pueda detectar con métodos no invasivos. Se debe dejar que transcurra el tiempo suficiente para que el conjugado anticuerpo-marcador entre en contacto con antígenos reactivos presentes en los tejidos del paciente, para posteriormente exponer al paciente a un dispositivo de detección e identificar el marcador detectable.

4.4.5 Kits

En otras realizaciones adicionales, la presente divulgación se refiere a kits de inmunodetección que se pueden emplear con los métodos de inmunodetección anteriormente descritos. Dado que las proteínas o los péptidos codificados se pueden emplear para detectar anticuerpos y que los correspondientes anticuerpos se pueden emplear para detectar proteínas o péptidos codificados, los kits pueden incluir cualquiera de estos componentes o ambos. Por tanto, los kits de inmunodetección comprenderán, en un medio contenedor adecuado, una proteína o péptido codificado, o un primer anticuerpo que se una a una proteína o péptido codificado, y un reactivo de inmunodetección.

En determinadas realizaciones, la proteína o el péptido codificado, o el primer anticuerpo que se une a la proteína o el péptido codificado, se puede unir a un soporte sólido, como la matriz de una columna o el pocillo de una placa de microtitulación.

Los reactivos de inmunodetección del kit pueden adoptar diversas formas, entre las que se incluyen las etiquetas detectables que están asociadas o unidas al anticuerpo o antígeno dado y las etiquetas detectables que están asociadas o unidas a un ligando de unión secundario. Algunos ejemplos de ligandos secundarios son los anticuerpos secundarios que tienen una afinidad de unión por el primer anticuerpo o antígeno y los anticuerpos secundarios que tienen una afinidad de unión por un anticuerpo humano.

Otros reactivos de inmunodetección adecuados para el uso en los presentes kits incluyen el reactivo de dos componentes que comprende un anticuerpo secundario que presenta una afinidad de unión por el primer anticuerpo o antígeno, junto con un tercer anticuerpo que presenta una afinidad de unión por el segundo anticuerpo, estando el tercer anticuerpo unido a una etiqueta detectable.

Los kits pueden comprender una composición convenientemente dividida en partes alícuotas del antígeno del polipéptido o la proteína codificada, etiquetadas o no, que pueden ser empleadas para preparar una curva estándar para un ensayo de detección.

Los kits pueden contener conjugados de anticuerpo-etiqueta sea en forma plenamente conjugada, en forma intermedia o como fragmentos separados que tendrán que ser conjugados por el usuario del kit. Los componentes de los kits podrán ser empaquetados en medios acuosos o en forma liofilizada.

5 Por lo general, los medios contenedores de los kits incluirán al menos un vial, un tubo de ensayo, un matraz, una botella, una jeringa u otro medio contenedor en el que se pueda poner el anticuerpo o antígeno y preferiblemente dividirse de forma conveniente en partes alícuotas. Por lo general, cuando se proporcione un segundo o tercer
10 ligando de unión u otro componente adicional, el kit también contendrá un segundo, tercer u otro contenedor adicional en el que poner este ligando o componente. Los kits de la presente divulgación también incluirán típicamente un medio para contener el anticuerpo, el antígeno y cualquier otro reactivo bien confinados para su distribución comercial. Estos contenedores pueden incluir contenedores de plástico conformados por inyección o por soplado para colocar los viales deseados.

4.5 Detección y cuantificación de especies de RNA

15 Una realización de la presente divulgación comprende un método para la identificación de células cancerígenas prostáticas en una muestra biológica, amplificando y detectando los ácidos nucleicos correspondientes al nuevo gen específico de la próstata (UC41) aquí documentado. La muestra biológica puede ser cualquier tejido o fluido en el que las células cancerígenas prostáticas se podrían encontrar presentes. Diversas realizaciones incluyen muestras de una prostatectomía radical, muestras patológicas, aspirado de médula ósea, aspirado de nódulo linfático, biopsia de nódulo linfático, tejido del bazo, aspirado con aguja fina, biopsia de piel o biopsia de tejido de órganos. Otras
20 realizaciones incluyen muestras en las que el fluido corporal es sangre periférica, suero, plasma, fluido linfático, ascitos, fluido sérico, efusión pleural, esputo, fluido cerebroespinal, fluido lacrimal, deposiciones, fluido prostático u orina.

25 El ácido nucleico empleado como plantilla para la amplificación es aislado de las células contenidas en la muestra biológica, de acuerdo con metodologías estándar (Sambrook *et al.*, 1989). El ácido nucleico puede ser ADN genómico, RNA de la célula completa o fraccionado. Cuando se emplea RNA, puede resultar recomendable convertir el RNA en un cADN complementario. En una realización, el RNA es RNA de una célula completa y se emplea directamente como plantilla para la amplificación.

30 Los pares de cebadores que se hibridan selectivamente con los ácidos nucleicos correspondientes a las SEQ. ID. N° 1, SEQ. ID. N° 2 o SEQ. ID. N° 3 se ponen en contacto con el ácido nucleico aislado en unas condiciones que permitan la hibridación selectiva. Una vez hibridado, el complejo ácido nucleico-cebador se pone en contacto con una o más enzimas que facilitan la síntesis del ácido nucleico dependiente de una plantilla. Se realizan múltiples rondas de amplificación, también denominadas "ciclos", hasta que se ha obtenido una cantidad suficiente del producto de la amplificación.

35 A continuación, se detecta el producto de la amplificación. En determinadas aplicaciones, la detección se puede realizar a través de medios visuales. Alternativamente, la detección puede implicar la identificación indirecta del producto mediante quimioluminiscencia, escintilografía radiactiva de la radioetiqueta o el marcador fluorescente incorporado o incluso a través de un sistema que emplea señales de impulsos eléctricos o térmicos (Affymax technology, Bellus, 1994).

40 Tras la detección, resulta posible comparar los resultados obtenidos en un paciente dado con un grupo de referencia estadísticamente significativo de pacientes normales y pacientes con cáncer de próstata. De este modo, resulta posible correlacionar la cantidad de ácido nucleico detectado con diversos estados clínicos.

4.5.1 Cebadores

45 El término cebador, para los fines del presente, abarca cualquier ácido nucleico capaz de cebar la síntesis de un ácido nucleico naciente en un proceso dependiente de una plantilla. Típicamente, los cebadores son oligonucleótidos de 10 a 20 pares de bases de longitud, aunque se pueden emplear secuencias más largas. Los cebadores se pueden proporcionar en forma de cadena única o cadena doble, aunque es preferible la forma de cadena única.

4.5.2 Métodos de amplificación dependiente de plantilla

50 Existen diversos procesos dependientes de una plantilla disponibles para amplificar las secuencias de ácido nucleico presentes en una muestra de plantilla determinada. Uno de los métodos de amplificación más conocidos es la reacción en cadena de polimerasa (denominada PCR[™]) que se describe detalladamente en las Patentes estadounidenses n° 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159, y en Innis *et al.*, 1990.

- Dicho en pocas palabras, en la PCR[™], se preparan dos secuencias del cebador que son complementarias a las regiones de las cadenas complementarias opuestas de la secuencia de ácido nucleico diana. Se añade un exceso de desoxinucleótidos trifosfato a una mezcla de reacción junto con una ADN polimerasa, p. ej., la polimerasa *Taq*. Si la secuencia del ácido nucleico diana está presente en una muestra, los cebadores se unirán al ácido nucleico diana y la polimerasa provocará que los cebadores se extiendan a lo largo de la secuencia del ácido nucleico diana añadiendo nucleótidos. Al aumentar y reducir la temperatura de la muestra de reacción, los cebadores extendidos se disociarán del ácido nucleico diana para formar productos de la reacción y el exceso de cebadores se unirá al ácido nucleico diana y a los productos de la reacción, y se repite el proceso.
- Se puede realizar un procedimiento de amplificación por PCR[™] de transcriptasa inversa, a fin de cuantificar la cantidad de mRNA amplificado. Los métodos de transcripción inversa del RNA en el cADN son bien conocidos y están descritos en Sambrook et al, 1989. Otros métodos alternativos para la transcripción inversa emplean ADN polimerasas termoestables. Estos cinco métodos se describen en WO 90/07641, presentado el 21 de diciembre de 1990. Las metodologías de la reacción en cadena de polimerasa son bien conocidas en el campo.
- Otro método para la amplificación es la reacción en cadena de ligasa (LCR), divulgada en la Solicitud europea nº 320 308. En la LCR, se preparan dos pares de sondas complementarias y en presencia de la secuencia diana cada uno de los pares se unirá a las cadenas complementarias opuestas de la diana de forma que se junten. En presencia de una ligasa, los dos pares de sondas se enlazarán para formar una única unidad. Mediante ciclos de temperatura, al igual que en la PCR[™], las unidades unidas por un enlace se disocian de la diana y a continuación sirven como "secuencias diana" para la unión de los pares de sondas sobrantes. La Patente estadounidense 4.883.750 describe un método similar a la LCR para la unión de pares de sondas a una secuencia diana.
- La Q beta Replicasa, descrita en la Solicitud PCT nº PCT/US87/00880 también se puede emplear como otro método de amplificación en la presente divulgación. En este método, una secuencia implicativa de RNA que tiene una región complementaria a la de una diana se añade a una muestra en presencia de una RNA polimerasa. La polimerasa copiará la secuencia implicativa que podrá entonces ser detectada.
- Un método de amplificación isotérmico, en el que las ligasas y endonucleasas de restricción se emplean para conseguir la amplificación de moléculas diana que contienen nucleótido de 5'-[a-tio]-trifosfato en una cadena de un sitio de restricción también puede resultar útil en la amplificación de ácidos nucleicos en la presente divulgación (véase Walker et al. (1992))
- La amplificación por desplazamiento de cadenas (SDA) es otro método de realizar la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos, que implica múltiples rondas de síntesis y desplazamiento de cadenas, es decir, traslación por muescas. Un método similar, denominado reacción de reparación en cadena (RCR) implica el anillado de varias sondas por toda la región diana de la amplificación, seguido de una reacción de reparación en la que solamente dos de las cuatro bases están presentes. Las otras dos bases se pueden añadir como derivados biotinilados para facilitar la detección. Un planteamiento similar se emplea en la SDA. Las secuencias diana específicas también se pueden detectar empleando una reacción de sonda cíclica (CPR). En la CPR, una sonda que tiene las secuencias 3' y 5' de ADN no específico y una secuencia intermedia de RNA específico se hibrida con el ADN que se encuentra presente en una muestra. Tras la hibridación, se trata la reacción con RNasa H y los productos de la sonda identificados como productos distintivos que son liberados tras la digestión. La plantilla original se anilla a otra sonda de ciclos y se repite la reacción.
- También se pueden emplear otros métodos de amplificación descritos en la Solicitud británica nº 2 202 328, y en la Solicitud PCT nº PCT/US89/01025, de acuerdo con la presente divulgación. En la primera solicitud, los cebadores "modificados" se emplean en una síntesis dependiente de enzima y de plantilla similar a la PCR[™]. Los cebadores pueden ser modificados mediante el marcado con una fracción de captura (como biotina) y o una fracción de detección (p. ej., enzima). En la segunda solicitud, se añade un exceso de sondas etiquetadas a una muestra. En presencia de la secuencia diana, la sonda se une y es clivada catalíticamente. Tras el clivaje, la secuencia diana se libera intacta para que se una a ella el exceso de sonda. El clivaje de la sonda etiquetada indica la presencia de la secuencia diana.
- Otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico incluyen los sistemas de amplificación basados en la transcripción, incluyendo la amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA) y 3SR. Véase Kwoh et al (1989); Gingeras et al, y la Solicitud PCT WO 88/10315. En la NASBA, los ácidos nucleicos se pueden preparar para la amplificación mediante una extracción de fenol/cloroformo estándar, la desnaturalización de la muestra clínica por calor, el tratamiento con solución tampón de lisis y columnas minispín para el aislamiento de ADN y RNA o la extracción de cloruro de guanidina de RNA. Estas técnicas de amplificación implican el anillado de un cebador que presenta secuencias específicas diana. Tras la polimerización, los híbridos de ADN/RNA se digieren con RNasa H mientras que las moléculas de ADN de doble cadena son desnaturalizadas nuevamente por calor. En cualquier caso, el ADN de cadena única se convierte completamente en cadena doble mediante la adición de un segundo

cebador específico diana, seguida de una polimerización. Las moléculas de ADN de cadena doble se transcriben entonces en múltiplos a través de una polimerasa como la T7 o SP6. En una reacción cíclica isotérmica, los RNA se transcriben inversamente en ADN de doble cadena y se transcriben una vez más con una polimerasa como T7 o SP6. Los productos resultantes, sean truncados o completos, indican secuencias diana específicas.

- 5 Davey *et al.*, Solicitud europea nº 329 822, divulga un proceso de amplificación de ácido nucleico que implica la sintetización cíclica de RNA de cadena única ("ssRNA"), ssADN y ADN de doble cadena (dsADN), que puede ser empleado de conformidad con la presente divulgación. El ssRNA es una primera plantilla para el oligonucleótido de un primer cebador, que se alarga mediante transcriptasa inversa (ADN polimerasa dependiente de RNA). El RNA es posteriormente retirado del dúplex ADN/RNA resultante mediante la acción de ribonucleasa H (RNasa H), una
- 10 RNasa específica para el RNA en dúplex con ADN o RNA). El ssADN resultante es una segunda plantilla para un segundo cebador, que también incluye las secuencias de un promotor de RNA polimerasa (ejemplificado por la RNA polimerasa T7) 5' con respecto a su homología con la plantilla. Este cebador es posteriormente extendido mediante la ADN polimerasa (ejemplificada por el fragmento largo Klenow de la ADN polimerasa I, procedente de *E. coli*), resultando en una molécula de ADN de doble cadena (dsADN), que presenta una secuencia idéntica a la del RNA original entre los cebadores y que posee adicionalmente, en un extremo, una secuencia promotora. Esta secuencia promotora puede ser empleada posteriormente por la RNA polimerasa apropiada para hacer muchas copias del RNA del ADN. Estas copias pueden después volver a entrar en el ciclo, permitiendo una amplificación muy rápida. Con la selección de enzimas apropiada, esta amplificación se puede realizar isotérmicamente, sin la adición de enzimas en cada ciclo. Dada la naturaleza cíclica de este proceso, se puede elegir que la secuencia de inicio sea en
- 20 forma de ADN o de RNA.
- Miller *et al.*, Solicitud PCT WO 89/06700, divulga un esquema de amplificación de la secuencia de ácido nucleico basado en la hibridación de una secuencia promotora/cebador con un ADN diana de cadena única (ssADN), seguida de la transcripción de muchas copias de RNA de la secuencia. Este régimen no es cíclico, es decir que no se producen nuevas plantillas de las transcripciones del RNA resultante. Otros métodos de amplificación incluyen la
- 25 "RACE" y "PCR" unilateral" (Frohman (1990) y Ohara *et al.* (1989)).

Los métodos basados en la unión de dos (o más) oligonucleótidos en presencia de ácido nucleico que presentan la secuencia del "di-oligonucleótido" resultante, amplificando así el di-oligonucleótido, también pueden emplearse para el paso de amplificación de la presente divulgación (Wu *et al.* (1989)).

4.5.3 Métodos de separación

- 30 Tras la amplificación, puede resultar recomendable separar el producto de la amplificación de la plantilla y el exceso de cebador, al objeto de determinar si se ha producido la amplificación específica. En una realización, los productos de la amplificación se separan mediante agarosa, agarosa-acrilamida o electroforesis en gel de poliacrilamida, empleando métodos estándar. Véase Sambrook *et al.*, 1989.
- 35 Alternativamente, se pueden emplear técnicas cromatográficas para realizar la separación. Existen muchos tipos de cromatografía que pueden ser empleados en la presente invención: adsorción, partición, intercambio de iones y tamiz particular, así como muchas técnicas especializadas para emplearlas, incluyendo la cromatografía con columna, en papel, en capa fina y de gases (Freifelder, 1982).

4.5.4 Métodos de identificación

- 40 Los productos de la amplificación pueden ser visualizados a fin de confirmar la amplificación de las secuencias de ácido nucleico diana. Un método típico de visualización implica el teñido de un gel con bromuro de etidio y la visualización bajo luz ultravioleta. Alternativamente, si los productos de la amplificación están íntegramente etiquetados con nucleótidos radioetiquetados o marcados fluorométricamente, los productos de la amplificación podrán ser posteriormente expuestos a una película de rayos X o visualizados bajo el espectro de estimulación apropiado, tras la separación.
- 45 En una realización, la visualización se consigue indirectamente. Tras la separación de los productos de la amplificación, se pone en contacto una sonda de ácido nucleico etiquetado con la secuencia de ácido nucleico diana amplificada. La sonda se conjuga preferiblemente con un cromóforo, aunque puede ser radioetiquetada. En otra realización, la sonda se conjuga con un socio de unión, como un anticuerpo o biotina, donde el otro miembro del par de unión porta una fracción detectable.
- 50 En una realización, la detección se realiza mediante un ensayo Southern blot y la hibridación con una sonda etiquetada. Las técnicas implicadas en el ensayo Southern blot son bien conocidas por aquellos versados en la materia y se pueden encontrar en muchos libros estándar sobre protocolos moleculares. Véase Sambrook *et al.*, 1989. Dicho brevemente, los productos de la amplificación se separan mediante electroforesis en gel.

Posteriormente el gel se pone en contacto con una membrana, como nitrocelulosa, permitiendo la transferencia del ácido nucleico y una unión no covalente. A continuación, la membrana se incuba con una sonda conjugada con un cromóforo que es capaz de hibridarse con un producto diana de la amplificación. La detección se realiza mediante la exposición de la membrana a una película de rayos X o dispositivos de detección mediante emisión de iones.

- 5 Un ejemplo de lo anterior se describe en la Patente estadounidense nº 5.279.721, que divulga un aparato y un método para la electroforesis y la transferencia automáticas de ácidos nucleicos. El aparato permite la electroforesis y la transferencia sin manipulación externa del gel y resulta ideal para realizar métodos conforme a la presente invención.

4.5.5 Componentes del kit

- 10 Todos los materiales y reactivos esenciales necesarios para la detección de ácidos nucleicos de UC41 en una muestra biológica se pueden incluir juntos en un kit. Por lo general, el kit comprenderá pares de cebadores preseleccionados para los ácidos nucleicos correspondientes a las SEQ. ID. Nº 1, SEQ. ID. Nº 3 o SEQ. ID. Nº 4. También podrá incluir enzimas adecuadas para la amplificación de ácidos nucleicos, incluyendo varias polimerasas (RT, Taq, etc.), desoxinucleótidos y tampones, a fin de proporcionar la mezcla de reacción necesaria para la
15 amplificación. Los kits preferibles también pueden comprender cebadores para la detección de un RNA de control expresado de forma no diferenciada, como β -actina, por ejemplo.

- Por lo general, los kits comprenderán, en medios adecuados, diferentes contenedores para cada uno de los reactivos y enzimas individuales, así como para cada par de cebadores. Los pares preferibles de cebadores para la
20 amplificación de ácidos nucleicos se seleccionan para amplificar las secuencias denominadas en el presente SEQ. ID. Nº 1, SEQ. ID. Nº 3 o SEQ. ID. Nº 4.

- En determinadas realizaciones, los kits comprenderán sondas de hibridación diseñadas para hibridarse con una secuencia o el complemento de una secuencia denominada en el presente SEQ. ID. Nº 1, SEQ. ID. Nº 3 o SEQ. ID. Nº 4. Por lo general, estos kits comprenderán, en medios adecuados para el confinamiento, diferentes contenedores
25 para cada uno de los reactivos y enzimas individuales, así como para cada sonda de hibridación.

4.6 Uso de la huella dactilar del RNA

- La huella dactilar de RNA es un medio por el que los RNA aislados de muchos tejidos diferentes, tipos de células o grupos de tratamiento pueden ser muestreados de forma simultánea para identificar los RNA cuyas abundancias
30 relativas varían. Dos formas de esta tecnología fueron desarrolladas simultáneamente y documentadas en 1992 como la huella dactilar de RNA mediante visualización diferencial (Liang y Pardee, 1992; Welsh *et al.* 1992). (Véase también Liang y Pardee, Patente estadounidense nº 5.262.311.) Ambas técnicas fueron utilizadas en los estudios descritos a continuación. Algunos de los estudios descritos en el presente se realizaron de forma similar a Donahue *et al.*, 1994.

- La técnica básica de la visualización diferencial ha sido descrita en detalle (Liang y Pardee, 1992). El RNA total de la célula es cebado para la transcripción inversa de la primera cadena con un cebador de anclaje compuesto de oligo dT. El cebador de oligo dT es extendido empleando una transcriptasa inversa, por ejemplo, la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV). La síntesis de la segunda cadena es cebada con un oligonucleótido elegido arbitrariamente, empleando condiciones de rigurosidad limitada. Una vez que se ha sintetizado el cADN de doble cadena, la amplificación continúa mediante técnicas de PCR™ estándar, utilizando los
40 mismos cebadores. La huella dactilar de ADN resultante es analizada mediante electroforesis en gel y teñido con bromuro de etidio o autorradiografía. Una comparación directa de las huellas dactilares obtenidas de diferentes RNA obtenidos de las células empleando los mismos cebadores de los oligonucleótidos identifica los mRNA que son expresados de forma diferenciada.

- La tecnología de la huella dactilar de RNA ha resultado efectiva para la identificación de genes que se expresan de forma diferenciada en el cáncer (Liang *et al.*, 1992; Wong *et al.*, 1993; Sager *et al.*, 1993; Mok *et al.*, 1994; Watson *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1995a; Chen *et al.*, 1995b; An *et al.*, 1995). La presente divulgación utiliza la técnica de la huella dactilar de RNA para identificar genes que se expresan de forma diferenciada en el cáncer de próstata. Estos estudios utilizaron los RNA aislados de los tejidos tumorales y líneas de células derivadas de tumores que se comportan como células tumorales con diferente potencial metastásico.

- 50 El concepto subyacente de estos estudios era que los genes que se expresan de forma diferenciada en células con diferentes potenciales metastásicos pueden ser empleados como indicadores del potencial metastásico. Dado que la metástasis es un requisito previo para la progresión del cáncer de próstata hacia patologías que supongan una

amenaza para la vida, es probable que los indicadores del potencial metastásico sean indicadores del potencial patológico.

La transcripción inversa (RT) del RNA a cADN seguida de una PCR[™] (RT-PCR[™]) cuantitativa relativa se puede emplear para determinar las concentraciones relativas de especies de mRNA específicas en una serie de RNA totales de las células aisladas de tejidos prostáticos normales, benignos y cancerosos. Al determinar que la concentración de una especie concreta de mRNA varía, se demuestra que el gen que codifica la especie de mRNA concreta se expresa de forma diferenciada. Esta técnica se puede emplear para confirmar que las transcripciones de mRNA que se ha demostrado que están diferencialmente reguladas por la huella dactilar de RNA se expresan de forma diferenciada en la progresión del cáncer de próstata.

Los problemas inherentes a las muestras clínicas es que son de cantidad variable (lo que dificulta la normalización) y de calidad variable (lo que exige la amplificación conjunta de un control interno fiable, preferiblemente de mayor tamaño que la muestra diana). Estos dos problemas se superan si la RT-PCR[™] se realiza como una RT-PCR[™] cuantitativa relativa con un estándar interno en el que el estándar interno es un fragmento de cADN amplificable mayor que el fragmento de cADN diana y en el que la abundancia del mRNA que codifica el estándar interno es unas 5-100 veces superior a la del mRNA que codifica la diana. Este ensayo mide la abundancia relativa, no la abundancia absoluta, de las respectivas especies de mRNA.

Otros estudios descritos a continuación se realizaron empleando una RT-PCR[™] cuantitativa relativa más convencional con un protocolo estándar externo. Estos ensayos prueban los productos de la PCR[™] en la porción lineal de sus curvas de amplificación. El número de ciclos de PCR[™] óptimo para el muestreo debe determinarse empíricamente para cada fragmento de cADN diana. Por otra parte, los productos de la transcriptasa inversa de cada población de RNA aislada de las diversas muestras de tejido pueden ser cuidadosamente normalizados para concentraciones iguales de cADN amplificables. Esto es muy importante, porque este ensayo mide la abundancia de mRNA absoluta. La abundancia de mRNA absoluta se puede emplear como medida de la expresión diferenciada de los genes solamente en muestras normalizadas. A pesar de que la determinación empírica del rango lineal de la curva de amplificación y la normalización de las preparaciones de cADN resultan procesos tediosos y que requieren mucho tiempo, los ensayos de RT-PCR[™] resultantes pueden ser superiores a los realizados con la RT-PCR[™] cuantitativa relativa con un estándar interno.

Una razón de ello es que sin el competidor/estándar interno, todos los reactivos pueden ser convertidos en un único producto de la PCR[™] en el rango lineal de la curva de amplificación, aumentando la sensibilidad del ensayo. Otra razón es que con solamente un producto de la PCR[™], la visualización del producto sobre un gel electroforético o algún otro método de visualización se vuelve menos complejo, tiene menos fondo y resulta más fácil de interpretar.

4.7 Diagnóstico y pronóstico del cáncer humano

En determinadas realizaciones, la presente divulgación permite el diagnóstico y pronóstico del cáncer de próstata humano detectando ácidos nucleicos específicos de la próstata, en particular aquellos que están sobreexpresados en el cáncer de próstata. El campo del diagnóstico y pronóstico del cáncer todavía se mantiene incierto. Se han propuesto diversos marcadores correlacionados con la metástasis y la malignidad. Por lo general, estos se pueden clasificar en marcadores citológicos, de proteínas o ácidos nucleicos.

Los marcadores citológicos incluyen elementos como la "redondez nuclear" (Diamond et al, 1982) y la ploidía celular. Los marcadores de la proteína incluyen el antígeno prostático específico (PSA) y CA125. Los marcadores de ácido nucleico han incluido la amplificación de Her2/neu, mutaciones puntuales en p53 o genes ras y cambios en los tamaños de segmentos de repeticiones de tripletes de cromosomas concretos.

Todos estos marcadores presentan determinadas desventajas, asociadas con falsos positivos y falsos negativos. Un falso positivo se produce cuando un individuo sin cáncer maligno presenta un "marcador cancerígeno". Por ejemplo, un PSA en suero elevado ha estado asociado con un carcinoma de próstata. Sin embargo, también aparece en algunos individuos con hiperplasia benigna de la próstata, no maligna. Un falso negativo se produce cuando un individuo padece realmente cáncer, pero la prueba no demuestra la presencia de un marcador específico. La incidencia de falsos negativos varía para cada marcador y también, con frecuencia, para cada tipo de tejido. Por ejemplo, se ha documentado que las mutaciones puntuales de ras oscilan desde un máximo del 95% en el cáncer de páncreas hasta un mínimo del 0% en algunos cánceres ginecológicos.

Otros problemas surgen cuando un marcador está presente solamente dentro de la propia célula transformada. Las mutaciones puntuales de ras pueden detectarse solamente dentro de la célula mutante y aparentemente no se encuentran presentes, por ejemplo, en el suero sanguíneo o la orina de individuos con carcinomas activados por ras. Esto significa que, a fin de detectar un tumor maligno, se debe tomar una muestra del propio tumor o de sus células metastásicas. Dado que el objeto de la detección del cáncer consiste en identificar y tratar los tumores antes de su

metástasis, básicamente se debe identificar y tomar una muestra de un tumor antes de que se pueda detectar la presencia del marcador del cáncer.

Finalmente, existen problemas específicos con los marcadores que se encuentran presentes en las células normales, pero ausentes en las células cancerígenas. La mayoría de las muestras de tumores contendrán poblaciones heterogéneas de células normales y transformadas. Si se busca un marcador que esté presente en las células normales, pero que se presente a niveles reducidos en las células transformadas, la señal "de fondo" de las células normales de la muestra puede enmascarar la presencia de las células transformadas.

El marcador ideal del cáncer sería uno que esté presente en los cánceres malignos y que no esté presente o esté expresado a niveles significativamente inferiores en los tumores benignos y las células normales. La presente invención aborda esta necesidad de marcadores del cáncer de próstata, al identificar un nuevo gen específico de la próstata (UC Band #41) que se expresa a niveles muy superiores en el carcinoma de próstata maligno que en el benigno o en la próstata normal. En particular, los resultados para UC Band #41 (SEQ. ID. Nº 1, SEQ. ID. Nº 3 y SEQ. ID. Nº 4) debatidos en los Ejemplos 1-5 siguientes resultan bastante prometedores en el sentido de que este marcador solamente se sobreexpresa de forma aparente en los tumores malignos y se encuentra presente a niveles muy bajos en la BPH o la próstata normal. Por otra parte, este gen se encuentra significativamente elevado en un alto porcentaje de los cánceres de próstata humanos examinados hasta la fecha.

Se espera que en las aplicaciones clínicas, las muestras de tejido humano serán estudiadas para detectar la presencia de los productos de expresión del UC41. Estas muestras podrían consistir en muestras para biopsia con aguja gruesa, muestras de resección quirúrgica, tejido de los nódulos linfáticos o suero. En determinadas realizaciones, los ácidos nucleicos se extraerían de estas muestras y se amplificarían como se ha descrito anteriormente. Algunas realizaciones utilizarían kits con pares de cebadores preseleccionados o sondas de hibridación. Los ácidos nucleicos amplificados se testarían para detectar los productos de expresión de UC41, por ejemplo, mediante electroforesis en gel y tñido con bromuro de etidio, o ensayo Southern blot o un medio de detección en fase sólida, como se ha descrito anteriormente. Estos métodos son bien conocidos en el campo. Los niveles del producto o los productos de expresión detectados se compararían con grupos estadísticamente válidos de muestras de próstata normal, benigna o maligna, metastásica o no metastásica. El diagnóstico y pronóstico del paciente individual se determinarían mediante comparación con estos grupos.

Otra realización de la presente divulgación implica la aplicación de técnicas de RT-PCR™ para detectar las células de cáncer de próstata en circulación (es decir, las que ya se han sometido a metástasis), empleando sondas y cebadores seleccionados de secuencias o sus complementos, designados en el presente como SEQ. ID. Nº 1, SEQ. ID. Nº 3 o SEQ. ID. Nº 4. Técnicas similares se han descrito en la Solicitud de patente PCT nº WO 94/10343.

En esta realización, las células del cáncer de próstata metastásicas se detectan en muestras hematopoyéticas mediante amplificación de las secuencias de ácido nucleico específicas del cáncer de próstata. Las muestras tomadas de la sangre o los nódulos linfáticos son tratadas como se describe a continuación para purificar el RNA total de la célula. El RNA aislado es sometido a transcripción inversa utilizando una transcriptasa inversa y cebadores seleccionados para unirse en condiciones altamente rigurosas a una secuencia de ácido nucleico de la secuencia de SEQ. ID. Nº 1, SEQ. ID. Nº 3 o SEQ. ID. Nº 4. Tras la transcripción inversa, los cADN resultantes son amplificados empleando técnicas de PCR™ estándar (descritas más abajo) y una ADN polimerasa termoestable.

La presencia de productos de la amplificación correspondientes a los ácidos nucleicos de UC41 puede ser detectada por varios medios alternativos. En una realización, el producto de la amplificación puede ser detectado mediante electroforesis en gel y tñido con bromuro de etidio. Alternativamente, tras el paso de la electroforesis en gel, el producto de la amplificación puede ser detectado mediante técnicas de ensayo Southern blot estándar, empleando una sonda de hibridación seleccionada para unirse específicamente a un ácido nucleico correspondiente a la SEQ. ID. Nº 1, SEQ. ID. Nº 3 o SEQ. ID. Nº 4. La hibridación de la sonda puede a su vez ser detectada a través de un medio de etiquetado estándar, por ejemplo, mediante la incorporación de [³²P]-nucleótidos seguida de autorradiografía. Los productos de la amplificación se pueden detectar alternativamente empleando un sistema de detección en fase sólida anteriormente descrito, utilizando una sonda de hibridación específica para la SEQ. ID. Nº 1, SEQ. ID. Nº 3 o SEQ. ID. Nº 4 y un medio de etiquetado apropiado. La presencia de ácidos nucleicos de UC41 en muestras de sangre o del nódulo linfático se puede considerar indicativa de un paciente con cáncer de próstata con metástasis.

4.8 Inhibición selectiva de un gen específico de la próstata

Principalmente, el nuevo gen específico de la próstata (UC41) identificado en la presente divulgación puede servir como diana para la intervención terapéutica en el cáncer de próstata.

Se podrían diseñar potenciales inhibidores de UC41. Esto se ve complicado por el hecho de que no se ha identificado ninguna función específica para estos productos genéticos y no se dispone de datos sobre sus estructuras tridimensionales.

- 5 La identificación de la función de la proteína se puede extrapolar, en algunos casos, de los datos de la secuencia primaria, siempre que exista una homología entre la secuencia de la proteína desconocida y una proteína de secuencia similar y función conocida. Las proteínas tienden a presentarse en grandes familias con una secuencia y función relativamente similares. Por ejemplo, diversas proteasas séricas, como la tripsina y quimiotripsina, presentan importantes homologías en su secuencia y unas estructuras tridimensionales relativamente similares. Otras categorías generales de proteínas homólogas incluyen las diferentes clases de factores de transcripción, proteínas receptoras de membrana, tirosina quinasas, proteínas de unión a GTP, etc. Es posible comprobar las homologías entre las secuencias de aminoácidos putativas que codifican el gen específico de la próstata de la presente invención y las secuencias de la base de datos de secuencias de proteínas del Fondo Nacional de Investigación Biomédica estadounidense. Las búsquedas de homologías son técnicas estándar para las personas cualificadas en el campo.
- 10
- 15 Incluso la estructura tridimensional se puede deducir de los datos de la secuencia primaria de la proteína o proteínas codificadas. Una vez más, si existen homologías entre las secuencias de aminoácidos codificadas y otras proteínas de estructura conocida, entonces se puede diseñar un modelo para la estructura de la proteína codificada, basándose en la estructura de la proteína conocida. Un ejemplo de este tipo de planteamiento fue documentado por Ribas de Pouplana y Fothergill-Gilmore (1994). Estos autores desarrollaron un modelo tridimensional detallado para la estructura de la alcoholdehidrogenasa de la *Drosophila*, basándose en parte en la homología de la secuencia con la estructura conocida de la 3- α 20- β -hidroxiesteroide deshidrogenasa. Una vez que se dispone de un modelo tridimensional, se pueden diseñar inhibidores mediante técnicas de modelización informática estándar. Este ámbito ha sido revisado por Sun y Cohen (1993).
- 20

4.8.1 Estructuras antisentido

- 25 Para los fines del presente, el término "antisentido" se refiere a moléculas de polinucleótido complementarias a una porción de un producto de expresión del RNA de UC41. Polinucleótidos "complementarios" son aquellos capaces de formar pares de bases, de acuerdo con las normas de complementariedad estándar de Watson-Crick. Es decir, las purinas mayores formarán pares de bases con las pirimidinas menores para formar combinaciones de guanina emparejada con citosina (G:C) y adenina emparejada con timina (A:T) en el caso del ADN o adenina emparejada con uracilo (A:U) en el caso del RNA. La inclusión de bases menos comunes, como inosina, 5-metilcitosina, 6-metiladenina, hipoxantina y otras en las secuencias de hibridación no interfiere en la formación de pares.
- 30

- Los polinucleótidos antisentido, cuando se introducen en una célula diana, se unen específicamente con su polinucleótido diana e interfieren en la transcripción, el procesamiento de RNA, el transporte, la traslación y/o la estabilidad. Las estructuras de RNA antisentido o el ADN que codifica estos RNA antisentido pueden ser empleadas para inhibir la transcripción o traslación genética, o ambas cosas, dentro de una célula hospedadora, sea *in vitro* o *in vivo*, como dentro de un animal hospedador, incluyendo un sujeto humano.
- 35

- La concentración intracelular del catión monovalente es aproximadamente de 160 mM (10 mM Na⁺; 150 mM K⁺). La concentración intracelular del catión bivalente es aproximadamente de 20 mM (18 mM Mg²⁺; 2 mM Ca²⁺). La concentración de proteína intracelular, que serviría para reducir el volumen de hibridación y, por tanto, aumentar la concentración efectiva de especies de ácido nucleico, es de 150 mg/ml. Las estructuras se pueden testar *in vitro* en condiciones que imiten a estas condiciones *in vivo*.
- 40

- Las estructuras antisentido pueden ser diseñadas para unirse al promotor y otras regiones de control, exones, intrones o incluso límites exón-intrón de un gen. Se contempla que las estructuras antisentido más efectivas para la presente invención incluirán las regiones complementarias del sitio de inicio del mRNA o de las secuencias identificadas en el presente como SEQ. ID. N° 1, SEQ. ID. N° 3 o SEQ. ID. N° 4. Estas estructuras se pueden testar fácilmente, con solo testar las estructuras *in vitro* para determinar si los niveles de la proteína diana se ven afectados. De forma similar, la inhibición no específica perjudicial de la síntesis de proteína también se puede medir determinando la viabilidad de la célula diana *in vitro*.
- 45

- Para los fines del presente, los términos "complementariedad" o "antisentido" significan polinucleótidos que son sustancialmente complementarios a lo largo de toda su longitud y que presentan muy pocas faltas de identidad de las bases. Por ejemplo, las secuencias de 15 bases de longitud se pueden denominar complementarias cuando tienen un nucleótido complementario en 13 o 14 nucleótidos de los 15. Naturalmente, las secuencias que son "completamente complementarias" serán secuencias que son enteramente complementarias en toda su longitud y que no presentan ninguna falta de identidad de las bases.
- 50

También se contemplan otras secuencias con un menor grado de homología. Por ejemplo, se podría diseñar una estructura antisentido que tiene regiones limitadas de alta homología, pero que también contiene una región no homóloga (p. ej., una ribozima). Estas moléculas, a pesar de tener una homología inferior al 50%, se unirían a secuencias diana bajo unas condiciones apropiadas.

5 Como se ha señalado anteriormente, a pesar de que las secuencias antisentido pueden ser copias del cADN en toda su longitud, o en grandes fragmentos del mismo, también pueden ser fragmentos más cortos, u "oligonucleótidos",
10 definidos en el presente como polinucleótidos de 50 bases o menos. A pesar de que los oligómeros más cortos (8-20) son más fáciles de producir e incrementan la accesibilidad *in vivo*, hay muchos otros factores implicados en la determinación de la especificidad de la formación de pares de bases. Por ejemplo, tanto la afinidad de unión como la especificidad de la secuencia de un oligonucleótido con su diana complementaria incrementan a medida que
15 aumenta la longitud. Se contempla que se emplearán oligonucleótidos de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o 100 pares de bases. A pesar de que en el contexto de la estructura antisentido se puede emplear la totalidad o una parte de la secuencia genética, estadísticamente cualquier secuencia de 14 bases de longitud se presentaría solamente una vez en el genoma humano y, por tanto, sería suficiente para especificar una secuencia diana única.

En determinadas realizaciones, puede que resulte recomendable emplear estructuras antisentido que incluyan otros elementos, por ejemplo los que incluyen C-5 propino pirimidinas. Se ha demostrado que los oligonucleótidos que contienen análogos a C-5 propino de la uridina y citidina se unen al RNA con gran afinidad y que son potentes inhibidores antisentido de la expresión genética (Wagner *et al.*, 1993).

20 Como alternativa a la aplicación del antisentido selectivo, pueden emplearse ribozimas selectivas. El término "ribozima" se refiere a una enzima basada en el RNA capaz de dirigirse a secuencias de bases de ADN y RNA concretas y clivarlas. Las ribozimas tienen dominios catalíticos específicos que presentan actividad de la endonucleasa (Kim y Cech, 1987; Gerlach *et al.*, 1987; Forster y Symons, 1987). Por ejemplo, muchas ribozimas aceleran las reacciones de transferencia de fosfoéster con un alto grado de especificidad, a menudo clivando
25 solamente uno de varios fosfoésteres en un sustrato de oligonucleótidos (Cech *et al.*, 1981; Michel y Westhof, 1990; Reinhold-Hurek y Shub, 1992). Esta especificidad se ha atribuido al requisito de que el sustrato se una a través de interacciones de pares de bases específicas a la secuencia de guía interna (IGS) de la ribozima, antes de la reacción química.

30 La catálisis de la ribozima se ha observado principalmente como parte de reacciones de clivaje/unión específicas de la secuencia en las que están implicados ácidos nucleicos (Joyce, 1989; Cech *et al.*, 1981). Por ejemplo, la Patente estadounidense nº 5.354.855 documenta que determinadas ribozimas pueden actuar como endonucleasas con una especificidad de la secuencia superior a la de ribonucleasas conocidas y cercana a la de las enzimas de restricción del ADN. De este modo, la inhibición de la expresión genética mediada por ribozimas específicas de la secuencia
35 puede resultar particularmente adecuada para aplicaciones terapéuticas (Scanlon *et al.*, 1991; Sarver *et al.*, 1990). Recientemente se ha documentado que las ribozimas provocan cambios genéticos en algunas líneas de células a las que se aplicaron: alteraban los genes, incluyendo los oncogenes H-ras, C-fos y genes del HIV. La mayor parte de este trabajo implicaba la modificación de un mRNA diana, basándose en un codón mutante específico clivado con una ribozima específica.

40 Las ribozimas se pueden dirigir directamente a las células, en forma de oligonucleótidos de RNA que incorporan secuencias de la ribozima, o introducirse en la célula como un vector de expresión que codifica el RNA deseado de la ribozima. Las ribozimas se pueden emplear y aplicar de forma muy parecida a la descrita para el polinucleótido antisentido. Las secuencias de ribozimas también se pueden modificar de forma muy parecida a la descrita para el polinucleótido antisentido. Por ejemplo, se podrían incorporar bases no Watson-Crick, o producir oligonucleótidos mixtos de RNA/ADN, o modificar el segmento principal de fosfodiéster, o modificar el 2'-hidroxilo del grupo de los
45 azúcares de la ribosa del RNA.

Alternativamente, de acuerdo con la presente invención, los oligonucleótidos y polinucleótidos antisentido pueden proporcionarse como RNA mediante transcripción desde las estructuras de expresión que portan ácidos nucleicos que codifican los oligonucleótidos o polinucleótidos. En toda esta aplicación, el término "estructura de expresión"
50 tiene por objeto incluir cualquier tipo de estructura genética que contenga un ácido nucleico que codifica un producto antisentido en el que se puede transcribir parte o la totalidad de la secuencia de ácido nucleico. Los vectores de expresión típicos incluyen fagos o plásmidos bacterianos, como cualquiera de las series de plásmidos pUC o Bluescript™, o, como se explica más detalladamente más adelante, vectores virales adaptados para el uso en células eucarióticas.

55 En realizaciones preferibles, el ácido nucleico codifica un oligonucleótido o polinucleótido antisentido bajo control transcripcional de un promotor. Un "promotor" se refiere a una secuencia de ADN reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o maquinaria sintética introducida, necesaria para iniciar la transcripción específica de un gen.

La expresión "bajo control transcripcional" significa que el promotor se encuentra en la ubicación y orientación adecuadas con respecto al ácido nucleico para controlar el inicio del RNA polimerasa.

5 El término promotor se empleará en el presente para referirse a un grupo de módulos de control transcripcional que están agrupados en torno al sitio de inicio del RNA polimerasa. Gran parte del pensamiento relativo a cómo se organizan los promotores se deriva de análisis de varios promotores virales, incluyendo los de la timidina-quinasa (tk) del HSV y las unidades de transcripción temprana del SV40. Estos estudios, así como trabajos más recientes, han demostrado que los promotores se componen de módulos funcionales discretos, compuestos cada uno de ellos por unos 7-20 bp de ADN y que contienen uno o más sitios de reconocimiento para el activador de la transcripción o las proteínas represoras.

10 Al menos un módulo de cada promotor funciona para posicionar el sitio de inicio para la síntesis de RNA. El ejemplo más conocido de ello es la caja TATA, pero en algunos promotores que carecen de una caja TATA, como el promotor para el gen de la desoxinucleotidil transferasa terminal de mamífero y el promotor para los genes tardíos del SV40, un elemento discreto que cubre el sitio de inicio propiamente dicho ayuda a fijar el lugar de inicio.

15 Otros elementos promotores adicionales regulan la frecuencia del inicio de la transcripción. Típicamente, estos se encuentran ubicados unos 30-110 bp en sentido ascendente con respecto al sitio de inicio, aunque recientemente se ha demostrado que algunos promotores contienen elementos funcionales también en sentido descendente con respecto al sitio de inicio. La separación entre elementos promotores suele ser flexible, de forma que la función del promotor se preserva cuando se invierten los elementos o se mueven con respecto a los demás. En el promotor tk, la separación entre elementos promotores se puede aumentar hasta 50 bp antes de que la actividad comience a decaer. Dependiendo del promotor, parece que los elementos individuales pueden funcionar de forma cooperativa o independientemente para activar la transcripción.

20 Se cree que el promotor concreto empleado para controlar la expresión de un ácido nucleico que codifica el péptido inhibidor no es importante, siempre que sea capaz de expresar el péptido en la célula diana. Por tanto, cuando la célula diana es una célula humana, es preferible posicionar el ácido nucleico que codifica el péptido inhibidor junto a un promotor y bajo el control de un promotor que sea activo en la célula humana. En términos generales, este promotor podría incluir un promotor humano o viral.

25 En determinadas realizaciones, se puede emplear el promotor del gen temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMV), el promotor temprano del SV40 y la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous, para obtener una expresión de alto nivel de diversas proteínas. También se contempla el uso de otros promotores de fagos bacterianos, células de mamíferos o virales bien conocidos en el campo, para conseguir la expresión de péptidos conforme a la presente invención, siempre que los niveles de expresión sean suficientes para un determinado fin. Al emplear un promotor con propiedades bien conocidas, se puede optimizar el nivel y el patrón de expresión de un oligonucleótido o polinucleótido antisentido. Asimismo, la selección de un promotor que se regule en respuesta a señales fisiológicas concretas puede permitir la expresión inducible de una proteína inhibidora. Por ejemplo, un ácido nucleico bajo control del promotor PAI-1 humano resulta en la expresión inducible por el factor de necrosis tumoral. Adicionalmente, se podría utilizar cualquier combinación de promotor/facilitador (conforme a la Base de datos de promotores eucarióticos –EPDB) para provocar la expresión de un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención. El uso de un sistema de expresión citoplásmico T3,T7 o SP6 es otra realización posible. Las células eucarióticas pueden favorecer la transcripción citoplásmica de determinados promotores bacterianos, si se proporciona la polimerasa bacteriana apropiada, sea como parte de un complejo administrado o como una estructura de expresión genética adicional.

30 Las Tablas 2 y 3 recogen diversos elementos/promotores que se pueden emplear, en el contexto de la presente invención, para regular la expresión del gen de interés. Esta lista no pretende ser exhaustiva con todos los elementos posibles implicados en la promoción del gen de expresión, sino simplemente dar algunos ejemplos de ellos.

35 Los facilitadores son elementos genéticos que incrementan la transcripción desde un promotor ubicado en una posición distante de la misma molécula de ADN. Los facilitadores están organizados de forma muy similar a los promotores. Es decir, se componen de muchos elementos individuales, uniéndose cada uno de ellos a una o más proteínas de transcripción.

40 La distinción básica entre facilitadores y promotores es operativa. Una región facilitadora en su conjunto debe ser capaz de estimular la transcripción a una distancia; esto no ocurre necesariamente con una región promotora o con los elementos que la componen. Por una parte, un promotor debe tener uno o más elementos que dirigen el inicio de la síntesis de RNA en un sitio concreto y en una orientación concreta, mientras que los facilitadores carecen de estas especificidades. A menudo los promotores y facilitadores se encuentran solapados y contiguos, por lo que suele parecer que tienen una organización modular muy similar.

A continuación se recoge una lista de promotores virales, promotores/facilitadores celulares y promotores/facilitadores inducibles que se podrían emplear en combinación con el ácido nucleico que codifica un gen de interés en una estructura de expresión (Tabla 2 y Tabla 3). Adicionalmente, también se podría emplear cualquier combinación de promotor/facilitador (conforme a la Base de Datos de Promotores Eucarióticos –EPDB)

5 para impulsar la expresión del gen. Las células eucarióticas pueden favorecer la transcripción citoplásmica de determinados promotores bacterianos, si se proporciona la polimerasa bacteriana apropiada, sea como parte de un complejo administrado o como una estructura de expresión genética adicional.

TABLA 2

10	FACILITADOR/PROMOTOR
	Cadena pesada de inmunoglobulina
	Cadena ligera de inmunoglobulina
15	Receptor de células T
	HLA DQ α y DQ β
	β -Interferón
	Interleucina-2
	Receptor de interleucina-2
20	MHC Clase II 5
	MHC Clase II HLA-DR α
	β -Actina
	Prealbúmina (transtiretina)
	creatina quinasa muscular
25	Elastasa /
	Metalotioneína
	Colagenasa
	Gen de albúmina
	α -Fetoproteína
30	t-Globina
	β -Globina
	e-fos
	c-HA-ras
	Insulina
35	Molécula de adhesión de célula neural (NCAM)
	α 1-Antitripsina
	Histona H2B (TH2B)
	Colágeno tipo I o de ratón
	Proteínas reguladas por glucosa (GRP94 y GRP78)
40	Hormona de crecimiento de rata
	Amiloide sérico humano A (SAA)
	Troponina I (TNI)
	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
	Distrofia muscular de Duchenne
45	SV40
	Polioma
	Retrovirus
	Virus del papiloma
	Virus de la hepatitis B
50	Virus de la inmunodeficiencia humana
	Citomegalovirus

TABLA 3

Elemento	Facilitador
MT II	Metales pesados del éster de forbol (TPA)
MMTV (virus del tumor mamario del ratón)	Glucocorticoides
β -Interferón	poli(rI)X, poli(rc)
Adenovirus 5 E2	Ela
c-jun	Éster de forbol (TPA), H ₂ O ₂
Colagenasa	Éster de forbol (TPA)
Estromelisina	Éster de forbol (TPA), IL-1
SV40	Éster de forbol (TPA)
Gen MX murino	Interferón, Virus de la enfermedad de Newcastle
Gen GRP78	A23187
α -2-Macroglobulina	IL-6
Vimentina	Suero
Gen MHC clase I H-2kB	Interferón
HSP70	Ela, Antígeno T largo del SV40
Proliferina	Éster de forbol-TPA
Factor de necrosis tumoral	FMA
Gen de la hormona estimulante del tiroides	Hormona tiroidea
Caja E de insulina	Glucosa

5 Cuando se emplea un elemento insertado de cADN, normalmente se incluirá una señal de poliadenilación para realizar una poliadenilación adecuada de la transcripción del gen. Se cree que la naturaleza de la señal de poliadenilación no resulta crucial para la práctica con éxito de la invención y se puede emplear cualquiera de estas secuencias, como las señales de poliadenilación del SV40 y de la hormona del crecimiento humano. También se contempla como elemento de la estructura de expresión un terminador. Estos elementos pueden servir para intensificar los niveles de mensaje y para minimizar la lectura de la estructura en otras secuencias.

10 En determinadas realizaciones de la divulgación, la administración de un ácido nucleico en una célula puede ser identificada *in vitro* o *in vivo* incluyendo un marcador en la estructura de expresión. El marcador resultaría en un cambio identificable en la célula transfectada, permitiendo la identificación de la expresión. Se pueden emplear enzimas como timidina-quinasa (tk) del virus del herpes simple (eucariótica) o cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) (procariótica).

15 También se puede incluir una señal de poliadenilación para efectuar una poliadenilación adecuada de la transcripción. Se cree que la naturaleza de la señal de poliadenilación no resulta crucial para la práctica con éxito de la invención y se puede emplear cualquiera de estas secuencias. Por ejemplo, se puede emplear la señal de poliadenilación del SV40, β -globina o adenovirus. También se contempla como elemento del cassette de expresión un terminador. Estos elementos pueden servir para intensificar los niveles de mensaje y para minimizar la lectura del cassette en otras secuencias.

20 4.8.2 Anticuerpos de cadena única

25 En otra realización más, un gen puede comprender un anticuerpo de cadena única. Los métodos para la producción de anticuerpos de cadena única son bien conocidos por aquellos versados en la materia, que deberán consultar la Patente estadounidense 5.359.046 para comprobar estos métodos. Un anticuerpo de cadena única se crea fusionando los dominios variables de las cadenas pesada y ligera empleando un enlace peptídico corto, reconstituyendo así un sitio de unión del antígeno en una única molécula.

30 Se han desarrollado fragmentos variables del anticuerpo de cadena única (scFvs) en los que el extremo C-terminal de un dominio variable está vinculado al extremo N-terminal del otro a través de un enlace o péptido de 15 a 25 aminoácidos, sin alterar de forma significativa la unión del antígeno o la especificidad de la unión (Bedzyk *et al.*, 1990; Chaudhary *et al.*, 1990). Estos Fvs carecen de las regiones constantes (Fc) presentes en las cadenas pesada y ligera del anticuerpo nativo. Se contemplan los anticuerpos de cadena única de los productos proteicos del gen UC41.

35 Los anticuerpos de cadena única pueden ser sintetizados mediante una célula, dirigidos a compartimentos celulares concretos y empleados para interferir de forma sumamente específica en el desarrollo y el metabolismo celular. Recientemente se han empleado anticuerpos de cadena única para la desactivación fenotípica de los receptores del factor de crecimiento, la inactivación funcional de p21ras y la inhibición de la replicación del HIV-1. Los anticuerpos

intracelulares ofrecen una alternativa sencilla y efectiva a otras formas de inactivación de genes, además de demostrar un claro potencial como reactivos para la terapia del cáncer y para el control de enfermedades infecciosas. Las proteínas de unión al antígeno de cadena única también representan potencialmente moléculas únicas para la administración selectiva de fármacos, toxinas o radionúclidos en el sitio del tumor y demuestran una mayor accesibilidad a las células tumorales *in vivo* (Yokoda *et al.*, 1992).

La presente divulgación también contempla que la terapia del anticuerpo de cadena única se puede combinar con la intervención quimioterapéutica o radioterapéutica.

4.8.3 Formulaciones liposomales

En determinadas realizaciones generales de la divulgación, los oligonucleótidos o polinucleótidos antisentido y/o vectores de expresión pueden ser contenidos en un liposoma. Los liposomas son estructuras vesiculares que se caracterizan por una membrana de doble capa de fosfolípidos y un medio acuoso interior. Los liposomas multilamelares disponen de múltiples capas de lípidos separadas por un medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos son suspendidos en un exceso de solución acuosa. Los componentes del lípido se someten a una reorganización antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las dobles capas de lípidos (Ghosh y Bachhawat, 1991). También se contemplan los complejos catiónicos de lípido-ácido nucleico, como los complejos de lipofectamina-ácido nucleico.

En determinadas realizaciones de la divulgación, el liposoma puede formar un complejo con un virus hemoaglutinante (HVJ). Se ha demostrado que esto facilita la fusión con la membrana celular y promueve la entrada en la célula del ADN encapsulado en el liposoma (Kaneda *et al.*, 1989). En otras realizaciones, el liposoma puede formar un complejo o emplearse conjuntamente con proteínas cromosómicas no histónicas nucleares (HMG-1) (Kato *et al.*, 1991). En otras realizaciones adicionales, el liposoma puede formar un complejo o emplearse conjuntamente tanto con HVJ como con HMG-1. En ellos, estos vectores de expresión se han utilizado con éxito para la transferencia y expresión de un polinucleótido *in vitro* e *in vivo*, por lo que resultan aplicables para la presente invención. Cuando se emplea un promotor bacteriano en la estructura de ADN, también resultará recomendable incluir dentro del liposoma una polimerasa bacteriana apropiada.

"Liposoma" es un término genérico que abarca diversos vehículos de lípidos multilamelares y simples, formados por la generación de dobles capas cerradas de lípidos. Los fosfolípidos se emplean para preparar los liposomas conforme a la presente divulgación y pueden portar una carga positiva neta, una carga negativa neta o ser neutros. Se puede emplear fosfato de dicetilo para conferir una carga negativa a los liposomas y la estearilamina se puede emplear para conferirles una carga positiva.

Los lípidos adecuados para el uso conforme a la presente divulgación se pueden obtener de fuentes comerciales. Por ejemplo, la fosfatidilcolina de dimiristilo ("DMPC") se puede obtener de Sigma Chemical Co., el fosfato de dicetilo ("DCP") se obtiene de K & K Laboratories (Plainview, NY); el colesterol ("Chol") se obtiene de Calbiochem (La Jolla, CA); el fosfatidilglicerol de dimiristilo ("DMPG") y otros lípidos se pueden obtener de Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, Ala.). Las reservas de soluciones de lípidos en cloroformo, cloroformo/metanol o t-butanol se pueden almacenar a unos -20°C. Preferiblemente, el cloroformo se emplea como disolvente único, dado que se evapora más fácilmente que el metanol.

Preferiblemente los fosfolípidos de fuentes naturales, como la fosfatidilcolina de la semilla de soja o el huevo, el ácido fosfatídico del cerebro, el fosfatidilinositol de las plantas o el cerebro, la cardiolipina del corazón y la fosfatidiletanolamina bacteriana o de las plantas, no se emplean como fosfatida primaria, es decir representando el 50% o más de la composición total de fosfatida, debido a la inestabilidad y permeabilidad de los liposomas resultantes.

Los liposomas empleados de acuerdo con la presente invención se pueden producir mediante diferentes métodos. El tamaño de los liposomas varía dependiendo del método de síntesis. Por lo general, un liposoma suspendido en una solución acuosa tiene forma de una vesícula esférica, con una o más capas concéntricas de moléculas de doble capa de lípidos. Cada capa se compone de una formación paralela de moléculas representada por la fórmula XY, donde X es una fracción hidrófila e Y es una fracción hidrófoba. En suspensión acuosa, las capas concéntricas están dispuestas de forma que las fracciones hidrófilas tienden a permanecer en contacto con una fase acuosa y las regiones hidrófobas tienden a autoasociarse. Por ejemplo, cuando hay fases acuosas presentes tanto dentro como fuera del liposoma, las moléculas lípidas formarán una doble capa, conocida como lamela, de la disposición XY-YX.

Los liposomas abarcados en el ámbito de la presente divulgación se pueden preparar de acuerdo con técnicas de laboratorio conocidas. En una realización preferible, los liposomas se preparan mezclando lípidos liposomales, en un disolvente dentro de un recipiente, como un matraz de vidrio en forma de pera. El recipiente deberá tener un

volumen diez veces mayor que el volumen de la suspensión de liposomas prevista. Empleando un evaporador giratorio, el disolvente se elimina a unos 40 °C bajo presión negativa. Normalmente el disolvente tarda en eliminarse entre unos 5 minutos y 2 horas, dependiendo del volumen deseado de los liposomas. La composición se puede secar también en un desecador con vacío. Por lo general, los lípidos secados son descartados una vez transcurrida una semana aproximadamente, dada su tendencia a deteriorarse con el paso del tiempo.

Los lípidos secados pueden ser hidratados con aproximadamente 25-50 mM de fosfolípido en agua estéril y libre de pirógenos, agitando hasta que la película del lípido quede resuspendida. Posteriormente, los liposomas acuosos pueden ser separados en partes alícuotas, colocados cada uno en un vial, liofilizados y sellados al vacío.

Alternativamente, los liposomas se pueden preparar de acuerdo con otros procedimientos de laboratorio conocidos: el método de Bangham *et al* (1965), el método de Gregoriadis, como se describe en *DRUG CARRIERS IN BIOLOGY AND MEDICINE*, G. Gregoriadis (1979), el método de Deamer y Uster (1983) y el método de evaporación de fase inversa descrito por Szoka y Papahadjopoulos (1978). Los métodos mencionados difieren en sus respectivas capacidades para atrapar material acuoso y en sus respectivos ratios de espacio acuoso frente a lípido.

Los lípidos secados o liposomas liofilizados preparados como se ha descrito anteriormente pueden ser reconstituídos en una solución de ácido nucleico y diluidos hasta una concentración apropiada en un disolvente adecuado, como DPBS. Posteriormente se agita la mezcla enérgicamente con un agitador vórtex. El ácido nucleico no encapsulado se elimina mediante centrifugado a 29.000 x g y se lavan las perlas liposomales. Los liposomas lavados son resuspendidos a una concentración de fosfolípido total apropiada, por ejemplo, de unos 50-200 mM. La cantidad de ácido nucleico encapsulada se puede determinar de conformidad con métodos estándar. Tras determinar la cantidad de ácido nucleico encapsulada en la preparación liposomal, los liposomas pueden ser diluidos hasta una concentración apropiada y almacenados a 4 °C hasta su uso.

En una realización preferible, se emplea el lípido dioleoilfosfatidilcolina. Los oligonucleótidos resistentes a la nucleasa se mezclaron con lípidos en presencia de un exceso de t-butanol. La mezcla se agitó con vórtex antes de ser congelada en un baño de acetona/hielo seco. La mezcla congelada fue liofilizada e hidratada con una solución tampón Hepes (1 mM Hepes, 10 mM NaCl, pH 7.5) hasta el día siguiente, y posteriormente los liposomas fueron sometidos a ultrasonidos en un baño de ultrasonidos durante 10 a 15 minutos. El tamaño de los oligonucleótidos liposomales típicamente oscilaba entre los 200-300 nm de diámetro, tal y como se determinó mediante un calibrador de partículas submicrón del modelo 370 (Nicomp, Santa Barbara, CA).

4.8.4 Sistemas de administración viral

Existen varios métodos para introducir vectores de expresión en las células. En determinadas realizaciones de la divulgación, la estructura de expresión comprende un virus o una estructura modificada obtenida de un genoma viral. La capacidad de determinados virus para entrar en las células mediante endocitosis mediada por receptor, para integrarse en el genoma de una célula hospedadora y expresar genes virales de forma estable y eficiente ha hecho que resulten candidatos atractivos para la transferencia de genes extraños a las células de mamíferos (Ridgeway, 1988; Nicolas y Rubenstein, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Temin, 1986). Por lo general, los vectores preferibles para la terapia genética son vectores virales.

A pesar de que algunos virus que pueden aceptar material genético extraño son limitados en cuanto al número de nucleótidos que pueden acomodar y en el rango de células que pueden infectar, se ha demostrado que estos virus resultan adecuados para la expresión genética. No obstante, los adenovirus no integran su material genético en el genoma hospedador y, por tanto, no precisan de la replicación del hospedador para la expresión genética, lo que hace que resulten particularmente adecuados para una expresión genética rápida, eficiente y heteróloga. Las técnicas para preparar virus infectivos de replicación son bien conocidas en el campo.

Por supuesto, al emplear sistemas de administración viral, resultará recomendable purificar el virión lo suficiente como para que quede básicamente libre de contaminantes no deseados, tales como partículas virales que interfieran de forma errónea o endotoxinas y otros pirógenos, para que no provoquen reacciones no deseadas en la célula, el animal o el individuo que recibe la estructura del vector. Un método preferible para purificar el vector implica el uso de gradientes de densidad ascendente, como el centrifugado con gradiente de cloruro de cesio.

Los virus empleados como vectores genéticos, como los virus de ADN, pueden incluir los papovavirus (p. ej., el virus del simio 40, el virus del papiloma bovino y el poliovirus) (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986) y adenovirus (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986).

Uno de los métodos preferibles para la administración *in vivo* implica el uso de un vector de expresión de adenovirus. A pesar de que los vectores de adenovirus son conocidos por tener una baja capacidad de integración

en el ADN genómico, esta característica se ve compensada por la elevada eficiencia de la transferencia genética que permiten estos vectores. El "vector de expresión de adenovirus" incluye aquellas estructuras que contienen secuencias de adenovirus suficientes como para (a) favorecer el empaquetado de la estructura y (b) expresar un polinucleótido antisentido que ha sido clonado en él.

5 El vector de expresión comprende una forma modificada genéticamente de adenovirus. El conocimiento de la organización genética del adenovirus, un virus de ADN de doble cadena, lineal, de 36 kb, permite la sustitución de grandes piezas de ADN adenoviral por secuencias extrañas de hasta 7 kb (Grunhaus y Horwitz, 1992). A diferencia de la infección retroviral, la infección adenoviral de las células hospedadoras no resulta en una integración cromosómica, porque el ADN adenoviral puede replicarse de manera episomal sin genotoxicidad potencial. Por otra parte, los adenovirus son estructuralmente estables y no se ha detectado ninguna reorganización del genoma tras una amplificación extensa. El adenovirus puede infectar prácticamente todas las células epiteliales, independientemente de la fase de su ciclo celular. Hasta ahora, la infección adenoviral parece estar asociada solamente con una enfermedad leve, como la enfermedad respiratoria aguda en los humanos.

15 El adenovirus resulta particularmente adecuado como vector de transferencia de genes, gracias a su genoma de tamaño medio, a su facilidad de manipulación, su elevada titulación, al amplio rango de células diana y su elevada infectividad. Ambos extremos del genoma viral contienen repeticiones invertidas (ITR) de 100-200 pares de bases, que son los elementos necesarios para la replicación y el empaquetado de ADN viral. Las regiones temprana (E) y tardía (L) del genoma contienen diferentes unidades de transcripción que son divididas al comienzo de la replicación del ADN viral. La región EI (EI A y EI B) codifica proteínas responsables de la regulación de la transcripción del genoma viral y unos cuantos genes celulares. La expresión de la región E2 (E2A y E2B) resulta en la síntesis de las proteínas para la replicación del ADN viral. Estas proteínas están implicadas en la replicación de ADN, en la expresión del gen tardío y en el aislamiento de la célula hospedadora (Renan, 1990). Los productos de los genes tardíos, incluyendo la mayoría de las proteínas de la cápside viral, se expresan solamente tras un significativo procesamiento de una única transcripción primaria emitida por el promotor mayor tardío (MLP). El MLP (ubicado a 16.8 m.u.) resulta particularmente eficiente durante la fase tardía de la infección y todos los mRNA emitidos por este promotor poseen una secuencia líder tripartita (TPL) 5' que hace que resulten los mRNA preferibles para la traslación.

25 En los sistemas empleados actualmente, el adenovirus recombinante se genera a partir de la recombinación homóloga entre el vector transportador y el vector provirus. Debido a la posible recombinación entre dos vectores provirales, con este proceso se pueden generar adenovirus de tipo salvaje. Por tanto, resulta fundamental aislar un único clon de virus de una placa individual y examinar su estructura genómica.

35 La generación y propagación de vectores de adenovirus que son deficientes en replicación dependen de una única línea de células coadyuvantes, denominada 293, que es transformada a partir de células de riñón embrionario humano mediante fragmentos de ADN Ad5 y expresa constitutivamente proteínas E1 (Graham et al., 1977). Dado que la región E3 puede prescindir del genoma del adenovirus (Jones y Shenk, 1978), los vectores de adenovirus actuales, con la ayuda de las células 293, portan el ADN extraño en la región E1, en la región E3 o en ambas (Graham y Prevec, 1991). En la naturaleza, el adenovirus puede contener aproximadamente el 105% del genoma de tipo salvaje (Ghosh-Choudhury et al., 1987), proporcionando capacidad para unos 2 kb adicionales de ADN. Combinada con los aproximadamente 5,5 kb de ADN que se pueden sustituir en las regiones E1 y E3, la capacidad máxima del vector de adenovirus actual es inferior a 7,5 kb o aproximadamente el 15% de la longitud total del vector. Más del 80% del genoma viral del adenovirus permanece en el segmento principal del vector y es la fuente de citotoxicidad que porta el vector. Por otra parte, la deficiencia de replicación del virus con E1 sometida a delección es incompleta. Por ejemplo, se ha observado una pérdida de expresión genética con los vectores actualmente disponibles a elevadas multiplicidades de infección (MOI (Mulligan, 1993).

45 Las líneas de células coadyuvantes se pueden obtener de células humanas, como las células de riñón embrionario humano, células musculares, células hematopoyéticas u otras células epiteliales o mesenquimales embrionarias humanas. Alternativamente, las células coadyuvantes se pueden obtener de las células de otras especies de mamíferos compatibles con los adenovirus humanos. Estas células incluyen, por ejemplo, células Vero u otras células epiteliales o mesenquimales embrionarias de mono. Como se ha mencionado, la línea de células coadyuvantes preferible es la 293.

55 Recientemente, Racher et al (1995) divulgó métodos mejorados para el cultivo de células 293 y la propagación del adenovirus. En un formato, los agregados de la célula natural se desarrollan inoculando células individuales en matraces de agitación de silicona de un litro (Techne, Cambridge, RU) que contenían 100-200 ml de medio. Tras agitar a 40 rpm, se estima la viabilidad de la célula con azul de tripano. En otro formato, se emplean microvehículos Fibra-Cel (Bibby Sterlin, Stone, RU) (5 g/l) como sigue. Un inóculo celular, resuspendido en 5 ml de medio, se añade al vehículo (50 ml) en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y se deja inmóvil, con agitación ocasional, entre 1 y 4 horas. Posteriormente el medio es sustituido por 50 ml de medio nuevo y comienza el agitado. Para la producción de

virus, se deja que las células se desarrollen hasta una confluencia aproximada del 80%. Transcurrido este tiempo, se sustituye el medio (hasta el 25% del volumen final) y se añade el adenovirus a una MOI de 0,05. Los cultivos se dejan inmóviles hasta el día siguiente y transcurrido este tiempo el volumen se aumenta hasta el 100% y comienza el agitado durante otras 72 horas.

5 Además del requisito de que el vector del adenovirus sea defectuoso en replicación, o al menos condicionalmente defectuoso, se cree que la naturaleza del vector de adenovirus no resulta crucial para la práctica con éxito de la invención. El adenovirus puede ser de cualquiera de los 42 serotipos diferentes que se conocen o de los subgrupos A-F. El adenovirus de tipo 5 del subgrupo C es el material de partida preferible, a fin de obtener el vector de
10 adenovirus de replicación defectuosa condicional para emplearlo en la presente invención. Esto se debe a que el adenovirus de tipo 5 es un adenovirus humano acerca del que se conoce mucha información genética y bioquímica, y se ha empleado históricamente para la mayoría de las estructuras que emplean adenovirus como vector.

Un vector típico aplicable para la práctica de la presente invención es defectuoso de replicación y no tendrá una región E1 de adenovirus. De este modo, resulta sumamente práctico introducir el polinucleótido que codifica el gen UC41 en la posición de la que se han eliminado las secuencias que codifican E1. No obstante, la posición de
15 inserción de la estructura dentro de las secuencias de adenovirus no resulta crítica. El polinucleótido que codifica el gen UC41 también se puede insertar en lugar de la región E3 sometida a delección en los vectores de sustitución de E3, tal y como describe Karlsson *et al.* (1986), o en la región E4, donde una línea de células coadyuvantes o virus coadyuvantes complementan el defecto de E4.

El adenovirus es fácil de desarrollar y manipular, y presenta una amplia gama de hospedadores *in vitro* e *in vivo*. Este grupo de virus se puede obtener en titulaciones elevadas, p. ej., 10^9 - 10^{11} de unidades formadoras de placa por ml, que resultan altamente infectivas. El ciclo de vida del adenovirus no precisa de la integración en el genoma de la célula hospedadora. Los genes extraños administrados mediante vectores de adenovirus son episomales y, por tanto, tienen una reducida genotoxicidad para las células hospedadoras. No se han documentado efectos secundarios en estudios de vacunación con adenovirus de tipo salvaje (Couch *et al.*, 1963; Top *et al.*, 1971), lo que
20 demuestra su seguridad y potencial terapéutico como vectores de transferencia de genes *in vivo*.

Los vectores de adenovirus se han empleado en la expresión de genes eucarióticos (Levrero *et al.*, 1991; Gomez-Foix *et al.*, 1992) y en el desarrollo de vacunas (Grunhaus y Horwitz, 1992; Graham y Prevec, 1991). Recientemente, estudios realizados con animales han sugerido que los adenovirus recombinantes se podrían emplear para la terapia genética (Stratford-Perricaudet y Perricaudet, 1991; Stratford-Perricaudet *et al.*, 1990; Rich *et al.*, 1993). Los estudios
30 sobre la administración de adenovirus recombinantes en diferentes tejidos incluyen la instilación en la tráquea (Rosenfeld *et al.*, 1991; Rosenfeld *et al.*, 1992), la inyección muscular (Ragot *et al.*, 1993), las inyecciones intravenosas periféricas (Herz y Gerard, 1993) y la inoculación estereotáctica en el cerebro (Le Gal La Salle *et al.*, 1993).

Otros vectores de transferencia de genes se pueden construir a partir de retrovirus.

35 Los retrovirus son un grupo de virus RNA de cadena única que se caracterizan por su capacidad para convertir su RNA en un ADN de cadena doble en células infectadas, a través de un proceso de transcripción inversa (Coffin, 1990).

El ADN resultante se integra posteriormente de manera estable en los cromosomas celulares como provirus y dirige la síntesis de proteínas virales. La integración resulta en la retención de las secuencias genéticas virales en la célula receptora y sus descendientes. El genoma retroviral contiene tres genes, *gag*, *pol*, y *env*, que codifican las proteínas de la cápside, la enzima de la polimerasa y los componentes envoltantes, respectivamente. Una secuencia encontrada en sentido ascendente del gen *gag* contiene una señal para el empaquetado del genoma en viriones. Hay dos secuencias de repetición terminal larga (LTR) presentes en los extremos 5' y 3' del genoma viral. Estas
40 contienen fuertes secuencias promotoras y facilitadoras, y también son necesarias para la integración en el genoma de la célula hospedadora (Coffin, 1990).

A fin de construir un vector retroviral, se inserta un ácido nucleico que codifica un gen UC41 en el genoma viral, en el lugar de determinadas secuencias virales, para producir un virus defectuoso en replicación. Para producir viriones, se construye una línea de células empaquetadoras que contienen los genes *gag*, *pol* y *env*, pero sin los componentes de LTR y empaquetado (Mann *et al.*, 1983). Cuando se introduce un plásmido recombinante que contiene un cADN, junto con las secuencias retrovirales de LTR y empaquetado, en esta línea de células (mediante precipitado de fosfato cálcico, por ejemplo), la secuencia de empaquetado permite que la transcripción de RNA del plásmido recombinante se empaquete en partículas virales, que posteriormente son secretadas en el medio de cultivo (Nicolas y Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann *et al.*, 1983). Los medios que contienen los retrovirus recombinantes son posteriormente recogidos, opcionalmente concentrados, y empleados para la transferencia de
55 genes. Los vectores retrovirales son capaces de infectar una amplia variedad de tipos de células. No obstante, la

integración y la expresión estable requieren de la división de las células hospedadoras (Paskind *et al*, 1975).

5 Recientemente se ha desarrollado un nuevo planteamiento diseñado para permitir la focalización específica de los vectores de retrovirus, basado en la modificación química de un retrovirus mediante la adición química de residuos de lactosa a la envoltura viral. Esta modificación podría permitir la infección específica de hepatocitos a través de receptores de sialoglicoproteína.

10 Se ha diseñado un planteamiento diferente para focalizar los retrovirus recombinantes, en el que se emplearon los anticuerpos biotinilados contra una proteína de la envoltura retroviral y contra un receptor de células específico. Los anticuerpos se unieron mediante los componentes de la biotina empleando estreptavidina (Roux *et al.*, 1989). Empleando anticuerpos contra los antígenos de clase I y de clase D del principal complejo de histocompatibilidad, se demostró la infección de una variedad de células humanas que portaba estos antígenos de superficie con un virus ecotrópico *in vitro* (Roux *et al.*, 1989).

15 Existen ciertas limitaciones para el uso de vectores de retrovirus. Por ejemplo, los vectores de retrovirus normalmente se integran en sitios aleatorios en el genoma de la célula. Esto puede provocar una mutagénesis de inserción mediante la interrupción de genes hospedadores o mediante la inserción de secuencias reguladoras virales que pueden interferir en la función de los genes adyacentes (Varmus *et al*, 1981). Otra preocupación asociada con el uso de vectores de retrovirus defectuosos es la potencial aparición de un virus competente en replicación de tipo salvaje en las células empaquetadoras. Esto puede provocar casos de recombinación en los que la secuencia intacta del virus recombinante se inserta en sentido ascendente desde la secuencia de *gag*, *pol*, *env* integrada en el genoma de la célula hospedadora. No obstante, ahora se dispone de nuevas líneas de células empaquetadoras, lo que debería reducir notablemente las posibilidades de recombinación (Markowitz *et al.*, 1988; Hersdorffer *et al.*, 1990).

25 Se pueden emplear otros vectores virales como estructuras de expresión. Se pueden emplear vectores obtenidos de virus como el virus Vaccinia (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar *et al.*, 1988), virus adenoasociados (AAV) (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Hermonat y Muzycska, 1984), y virus del herpes. Estos ofrecen varias características atractivas para diversas células de mamíferos (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar *et al*, 1988; Horwich *et al.*, 1990).

30 Con el reciente reconocimiento de virus defectuosos de la hepatitis B, se han adquirido nuevos conocimientos sobre la relación entre la estructura y la función de diferentes secuencias virales. Los estudios *in vitro* han demostrado que el virus podría conservar la capacidad de empaquetado y transcripción inversa dependiente de adyuvantes, a pesar de la delección de hasta el 80% de su genoma (Horwich *et al.*, 1990). Esto sugiere que se pueden sustituir grandes porciones del genoma por material genético extraño. El hepatotropismo y la persistencia (integración) son propiedades particularmente atractivas para la transferencia de genes dirigida al hígado. Changer *et al.* (1991) ha introducido recientemente el gen del cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) en el genoma del virus de la hepatitis B del pato en el lugar de las secuencias de codificación de polimerasa, superficie y presuperficie. Fue transfectado con virus de tipo salvaje en una línea de células de hepatoma aviar. Se emplearon medios de cultivo que contenían elevados títulos del virus recombinante para infectar los hepatocitos primarios de los patos. La expresión estable del gen CAT se detectó durante al menos 24 días a partir de la transfección (Chang *et al*, 1991).

40 Para obtener la expresión de estructuras de genes sentido y antisentido, la estructura de la expresión debe ser administrada en una célula. Esta administración se puede realizar *in vitro*, como en procedimientos de laboratorio para la transformación de líneas de células, o *in vivo* o *ex vivo*, como en el tratamiento de determinados estados patológicos. Un mecanismo para la administración es a través de la infección viral, donde la estructura de expresión es encapsulada en una partícula viral infecciosa.

4.8.5 Métodos no virales

45 También se contemplan varios métodos no virales para la transferencia de estructuras de expresión a células de mamífero cultivadas. Estos incluyen el precipitado con fosfato cálcico (Graham y Van Der Eb, 1973; Chen y Okayama, 1987; Rippe *et al*, 1990), DEAE-dextrano (Gopal, 1985), electroporación (Tur-Kaspa *et al*, 1986; Potter *et al*, 1984), microinyección directa (Harland y Weintraub, 1985), liposomas cargados con ADN (Nicolau y Sene, 1982; Fraley *et al*, 1979) y baño de ultrasonidos de células de complejos de lipofectamina-ADN (Fechheimer *et al*, 1987), bombardeo de genes empleando microproyectiles de alta velocidad (Yang *et al*, 1990), y transfección mediada por receptores (Wu y Wu, 1987; Wu y Wu, 1988). Algunas de estas técnicas se pueden adaptar con éxito para el uso *in vivo* o *ex vivo*.

55 En una realización de la divulgación, la estructura de expresión puede consistir simplemente en un vector recombinante desnudo. La transferencia de la estructura se puede realizar mediante cualquiera de los métodos anteriormente mencionados que permeabilice física o químicamente la membrana celular. Por ejemplo, Dubensky *et*

al (1984) inyectó con éxito ADN de poliomavirus en forma de precipitados de CaPO_4 en el hígado y el bazo de ratones adultos y recién nacidos, demostrando la replicación viral activa y la infección aguda. Benvenisty y Neshif (1986) también demostraron que la inyección intraperitoneal directa de plásmidos precipitados con CaPO_4 resulta en la expresión de los genes transfectados. Se prevé la secuencia de ADN que codifica una estructura de UC41 antisentido también se podrá transferir de manera similar *in vivo*.

Una vez que se ha administrado la estructura de expresión en la célula, el ácido nucleico que codifica el gen UC41 puede posicionarse y expresarse en diferentes sitios. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el gen puede integrarse de forma estable en el genoma de la célula. La integración puede ser en la orientación y localización del cognado mediante recombinación homóloga (sustitución de genes) o se puede producir en un lugar aleatorio no específico (aumento de genes). En otras realizaciones adicionales, el ácido nucleico se puede mantener de forma estable en la célula como un segmento episomal separado de ADN. Estos segmentos de ácido nucleico o "episomos" codifican secuencias suficientes para permitir el mantenimiento y la replicación de forma independiente o sincronizada con el ciclo de la célula hospedadora. La forma de administración de la estructura de expresión en la célula y el lugar de la célula en el que permanece el ácido nucleico dependerá del tipo de estructura de expresión empleado.

4.8.6 Composiciones farmacéuticas y vías de administración

Cuando se proceda a la aplicación clínica de liposomas que contienen oligonucleótidos o polinucleótidos o vectores de expresión antisentido, será necesario preparar el complejo de liposomas como una composición farmacéutica apropiada para la aplicación prevista. Por lo general, esto supondrá la preparación de una composición farmacéutica básicamente libre de pirógenos, así como de cualquier otra impureza que pueda ser nociva para los seres humanos o los animales. Por lo general, resultará recomendable emplear tampones apropiados para que el complejo sea estable y permita la adsorción por parte de las células hospedadoras.

Las composiciones acuosas comprenden una cantidad efectiva del vector de expresión antisentido encapsulada en un liposoma, como se ha indicado anteriormente, dispersada además en un medio acuoso o vehículo farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones también se denominan inóculos. Las expresiones "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refieren a composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción indeseada, cuando son administradas a un animal o a un ser humano, según corresponda.

Para los fines del presente, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares. El uso de estos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en el campo. Salvo en la medida en que cualquier agente o medio convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También se pueden incorporar ingredientes activos complementarios a las composiciones.

Las soluciones de las composiciones terapéuticas se pueden preparar en agua convenientemente mezclada con un agente tensioactivo, como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, glicoles de polietileno líquido, mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Las composiciones terapéuticas de la presente divulgación se administran de forma ventajosa en forma de composiciones inyectables, sea como soluciones líquidas o suspensiones; también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para la disolución o suspensión en líquido antes de la inyección. Estas preparaciones también pueden ser emulsionadas. Una composición típica para este fin comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, la composición puede contener 10 mg, 25 mg, 50 mg o hasta 100 mg de albúmina sérica humana por mililitro de solución tampón de fosfato. Otros vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas, excipientes no tóxicos, incluyendo sales, conservantes, tampones y similares.

Algunos ejemplos de disolventes no acuosos son el glicol de propileno, glicol de polietileno, aceite vegetal y ésteres orgánicos inyectables, como el etiloleato. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones alcohólicas/acuosas, soluciones salinas, vehículos parenterales como el cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, etc. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de líquidos y nutrientes. Los conservantes incluyen agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes. El pH y la concentración exacta de los diversos componentes de la composición farmacéutica se ajustan conforme a parámetros bien conocidos.

Una cantidad efectiva de la composición terapéutica se determina basándose en el objetivo previsto. El término "dosis unitaria" o "dosis" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas para el uso en un sujeto, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de la composición terapéutica, calculada para producir las

respuestas deseadas, como se ha indicado anteriormente, en asociación con su administración, es decir la vía adecuada y el régimen de tratamiento. La cantidad a administrar, de acuerdo tanto con el número de tratamientos como con la dosis unitaria, dependerá de la protección deseada.

- 5 Las cantidades precisas de la composición terapéutica también dependerán del criterio médico y son específicas para cada individuo. Los factores que afectan a la dosis incluyen el estado físico y clínico del paciente, la vía de administración y la potencia, la estabilidad y toxicidad de la sustancia terapéutica concreta. Para la aplicación presente, se prevé que la cantidad de composición terapéutica que comprende una dosis unitaria oscilará entre los 5-30 mg de polinucleótido.

4.9 Métodos para el tratamiento de malignidades relacionadas con el UC41

- 10 La presente divulgación también contempla, en otra realización, el tratamiento del cáncer de próstata. Los tipos de cáncer que se pueden tratar, de acuerdo con la presente invención, están limitados únicamente por la participación de UC41. Por participación se entiende que ni siquiera es necesario que el UC41 haya mutado o presente anomalías; la sobreexpresión o infraexpresión de la proteína o proteínas codificadas por este gen puede ser un factor primario en el desarrollo del cáncer de próstata. Por tanto, se contempla que los tumores podrán ser tratados empleando terapia de expresión o antisentido dirigida al producto o los productos del gen UC41.

- 15 En muchos contextos, no es necesario matar la célula tumoral ni provocar la muerte celular normal o "apoptosis". Por lo contrario, para aplicar un tratamiento significativo, basta con que el crecimiento tumoral se ralentice en cierto grado. No obstante, es posible que el crecimiento tumoral quede completamente bloqueado o que se consiga cierta regresión del tumor. La terminología clínica como "remisión" y "reducción de la carga tumoral" también se contemplan, dado su uso normal.

4.9.1 Terapias de base genética

- 25 Una de las realizaciones terapéuticas contempladas es la intervención, a nivel molecular, en los eventos implicados en la tumorigénesis de algunos cánceres. Más concretamente, se pretende administrar, en una célula cancerígena, una estructura antisentido capaz de inhibir la expresión de UC41 en esa célula. Los vectores de expresión particularmente preferibles son vectores virales, como adenovirus, virus adenoasociado, virus del herpes, virus Vaccinia y retrovirus. También es preferible el vector de expresión encapsulado en liposomas.

- 30 Aquellos versados en la materia saben bien cómo aplicar la administración de genes *in vivo* y *ex vivo*. Para los vectores virales, por lo general se prepara una reserva de vector viral. Dependiendo del tipo de virus y del título alcanzable, se administrarán entre 1×10^4 y 1×10^{12} partículas infecciosas al paciente. Cifras similares se pueden extrapolar a las formulaciones en liposomas y otras formulaciones no virales comprando las eficiencias de absorción relativas. La formación como una composición farmacéuticamente aceptable se debate más adelante.

- 35 Se contemplan diversas vías para varios tipos de tumores. La siguiente sección sobre las vías contiene una extensa lista de posibles vías. Prácticamente para cualquier tumor, se contempla la administración sistémica. Esto resultará especialmente importante para atacar al cáncer metastásico o microscópico. Cuando se pueda identificar una masa tumoral discreta, se podrán emplear diversos enfoques regionales y locales directos. Por ejemplo, se puede inyectar el vector de expresión directamente en el tumor. Un lecho tumoral puede ser tratado antes, durante o después de la resección. Tras la resección, por lo general se administrará el vector a través de un catéter colocado después de la cirugía. Se podrá utilizar la vasculatura tumoral para introducir el vector en el tumor, pinchando una arteria o una vena de apoyo. También se puede utilizar una vía de administración en la sangre más distal.

- 40 En una realización diferente, se contempla la terapia genética *ex vivo*. Este enfoque resulta particularmente adecuado, aunque a título meramente enunciativo, para el tratamiento de los cánceres asociados con la médula ósea. En una realización *ex vivo*, las células del paciente son retiradas y mantenidas fuera del cuerpo durante al menos algún período de tiempo. Durante este período se aplica una terapia y posteriormente se reintroducen las células en el paciente. Preferiblemente se habrán matado todas las células tumorales de la muestra.

45 4.9.2 Inmunoterapias

- 50 Por lo general, las inmunoterapias confían en el uso de células efectoras y moléculas inmunitarias para dirigirse a las células cancerígenas y matarlas. La efectora inmunitaria puede ser, por ejemplo, un anticuerpo específico para algún marcador en la superficie de una célula tumoral. El anticuerpo solamente puede servir como efector de la terapia o puede reclutar a otras células para proceder a matar la célula realmente. El anticuerpo también puede estar conjugado con un fármaco o toxina (quimioterapéutico, radionúclido, cadena A de ricina, toxina de cólera, toxina de la tóserina, etc.) y servir simplemente como un agente conductor a la diana. Alternativamente, el efector puede ser

un linfocito que porta una molécula de superficie que interactúa, sea directa o indirectamente, con el objetivo de una célula tumoral. Diversas células efectoras incluyen células NK y células T citotóxicas.

De acuerdo con la presente divulgación, el UC41 nativo o de tipo salvaje puede ser una diana para un efector inmunitario. Es posible dirigirse al UC41 mediante inmunoterapia, mediante el uso de anticuerpos, conjugados de anticuerpos o células efectoras inmunitarias.

Alternativamente, se podría emplear la inmunoterapia como parte de una terapia combinada, conjuntamente con la terapia genética dirigida al UC41. El planteamiento general para la terapia combinada se debate más adelante. Por lo general, la célula tumoral debe portar algún marcador al que dirigirse, es decir que no esté presente en la mayoría de las demás células. Existen muchos marcadores tumorales y cualquiera de ellos puede ser adecuado para la focalización en el contexto de la presente invención. Los marcadores tumorales habituales incluyen el antígeno carcinoembrionario, el antígeno prostático específico, el antígeno asociado a tumor urinario, el antígeno fetal, la tirosinasa (p97), gp68, TAG-72, HMFG, el antígeno Sialyl Lewis, MucA, MucB, PLAP, el receptor de estrógenos, el receptor de laminina, *erb B* y p155.

4.9.3 Terapia combinada con inmunoterapia, quimioterapia o radioterapia

La resistencia de la célula tumoral a los agentes dañinos del ADN representa un importante problema en la oncología clínica. Un objetivo del investigador del cáncer actual consiste en encontrar formas de mejorar la eficacia de la quimioterapia y radioterapia. Una forma consiste en combinar estas terapias tradicionales con la terapia genética. Por ejemplo, el gen de la timidina quinasa del herpes simple (HS-tk), cuando se administra en tumores cerebrales a través de un sistema de vector retroviral, provocó con éxito la susceptibilidad al agente antiviral ganciclovir (Culver *et al.*, 1992). En el contexto de la presente divulgación, se contempla que la terapia genética del UC41 se podría emplear de manera similar, conjuntamente con la intervención quimioterapéutica o radioterapéutica.

Para matar células, inhibir el crecimiento celular, inhibir la metástasis, inhibir la angiogénesis o invertir o reducir de otra forma el fenotipo maligno de las células tumorales empleando los métodos y composiciones de la presente invención, por lo general se podrá en contacto una célula "diana" con una estructura antisentido de UC41 y al menos otro agente. Estas composiciones se podrían proporcionar en una cantidad combinada efectiva para matar o inhibir la proliferación de la célula. Este proceso puede implicar poner en contacto las células con la estructura antisentido y el agente o agentes y el factor o factores al mismo tiempo. Esto se puede lograr poniendo en contacto la célula con una única composición o formulación farmacológica que incluya ambos agentes, o bien poniendo en contacto la célula con dos composiciones o formaciones distintas de forma simultánea, donde una composición incluye la estructura de expresión o antisentido y la otra incluye el agente.

Alternativamente, el tratamiento con terapia genética puede preceder o seguir al tratamiento con el otro agente, a intervalos que oscilarán entre un minuto y una semana. En realizaciones en las que el otro agente y la estructura de expresión se aplican por separado a la célula, por lo general se garantizará que no haya transcurrido un período de tiempo significativo entre el momento de cada administración, de forma que el agente y la estructura de expresión todavía puedan ejercer un efecto combinado (p. ej., sinérgico) beneficioso sobre la célula. En estos casos, se contempla que se podría en contacto la célula con las dos modalidades con un plazo de unas 12-24 horas de diferencia y, más preferiblemente, con un plazo de unas 6-12 horas de diferencia, siendo preferible una diferencia máxima de unas 12 horas. En algunas situaciones, puede resultar recomendable prolongar la duración del tratamiento solamente con el agente terapéutico de forma significativa, por ejemplo, en las que transcurran varios días (2, 3, 4, 5, 6 o 7) hasta varias semanas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8) entre las respectivas administraciones.

También se contempla que resulte recomendable más de una administración de la estructura antisentido de UC41 o del otro agente. Se pueden emplear diversas combinaciones, en las que UC41 es "A" y el otro agente es "B", como se ejemplifica a continuación:

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B B/A/A A/B/B B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B B/B/B/A A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A A/B/B/B B/A/B/B B/B/A/B

Para conseguir matar la célula, ambos agentes se administran en una célula en una cantidad combinada efectiva para matar la célula.

Los agentes o factores adecuados para el uso en una terapia combinada son cualquier compuesto químico o método de tratamiento que produzca el daño del ADN al aplicarlo a una célula. Estos agentes y factores incluyen la radiación y ondas que producen el daño del ADN como los rayos gamma, los rayos X, los rayos ultravioleta, las microondas, las emisiones electrónicas y similares. Diversos compuestos químicos, también descritos como "agentes quimioterapéuticos" funcionan para inducir el daño del ADN y se contempla que todos ellos resultan útiles

- 5 en los métodos de tratamiento combinados divulgados en el presente. Los agentes quimioterapéuticos contemplados como útiles incluyen, por ejemplo, adriamicina, 5-fluorouracilo (5FU), etoposido (VP-16), camptotecina, actinomycin-D, mitomicina C, cisplatina (CDDP) e incluso peróxido de hidrógeno. La invención también abarca el uso de una combinación de uno o más agentes que inducen los daños del ADN, sean compuestos reales o basados en la radiación, como el uso de rayos X con cisplatina o el uso de cisplatina con etoposido.
- 10 Para el tratamiento del cáncer de acuerdo con la divulgación, se pondrían en contacto las células tumorales con un agente adicional a la estructura antisentido. Esto se puede conseguir radiando el sitio del tumor localizado con rayos X, luz ultravioleta, rayos gamma o incluso microondas. Alternativamente, se pueden poner en contacto las células tumorales con el agente, administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende un compuesto, como adriamicina, S-fluoroacilo, etoposido, camptotecina, actinomicina-G o mitomicina C. El agente se puede preparar y utilizar como una composición terapéutica combinada o un kit, combinándolo con una estructura antisentido de UC41, como se ha descrito anteriormente.
- 15 Se contemplan agentes que generan enlaces cruzados directamente con ácidos nucleicos, concretamente el ADN, para facilitar que los daños del ADN conduzcan a una combinación sinérgica, antineoplásica con el UC41. Pueden emplearse agentes como la cisplatina y otros agente alquilantes del ADN.
- 20 Los agentes que dañan el ADN también incluyen compuestos que interfieren en la segregación cromosómica, la mitosis y la replicación del ADN. Estos compuestos quimioterapéuticos incluyen la adriamicina, también conocida como doxorubicina, etoposido, verapamil, podofilotoxina y similares. Ampliamente utilizados en el entorno clínico para el tratamiento de neoplasias, estos compuestos se administran por vía intravenosa a través de inyecciones de bolos, a dosis que oscilan entre los 25-75 mg/m² a intervalos de 21 días en el caso de la adriamicina, y los 35-50 mg/m² del etoposido intravenoso o el doble de la dosis intravenosa para la administración oral.
- 25 Los agentes que alteran la síntesis y la fidelidad de las subunidades y los precursores del ácido nucleico también provocan daños del ADN. Se han desarrollado varios precursores de ácido nucleico para este fin. Particularmente útiles resultan los agentes que se han sometido a extensas pruebas y resultan de fácil acceso, como el 5-fluorouracilo (5-FU). A pesar de ser bastante tóxico, el 5-FU es aplicable en un amplio rango de vehículos, incluyendo el uso tópico. No obstante, normalmente se utiliza la administración intravenosa con dosis que oscilan entre los 3 y los 15 mg/kg/día.
- 30 Otros factores que causan daños del ADN y que han sido ampliamente utilizados incluyen los rayos gamma, los rayos X y/o la administración dirigida de radioisótopos a las células tumorales. También se contemplan otras formas de factores que causan los daños del ADN, como las microondas y los rayos ultravioleta. Es sumamente probable que todos estos factores provoquen un amplio rango de daños del ADN, sobre los precursores del ADN, la replicación y reparación del ADN y la construcción y el mantenimiento de cromosomas. Los rangos de dosis para los rayos X oscilan desde dosis diarias de 50 a 200 roentgens para períodos de tiempo prolongados (de 3 a 4 semanas) hasta dosis únicas de 2000 a 6000 roentgens. Los rangos de dosis para los radioisótopos varían en gran medida y dependen de su vida media, de la fuerza y el tipo de la radiación emitida, y de la absorción por parte de las células neoplásicas.
- 35 Aquellos versados en la materia deberán consultar "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, capítulo 33, y en particular las páginas 624-652. Necesariamente se producirá cierta variación en la dosificación, dependiendo de la condición del sujeto a tratar. En cualquier caso, la persona responsable de la administración determinará la dosis apropiada para el sujeto individual. Por otra parte, para la administración a seres humanos las preparaciones deben satisfacer unas normas de esterilidad, pirogenicidad y seguridad y pureza generales, tal como exige la normativa de la Oficina de Biología de la FDA.
- 40 Los inventores proponen que la administración regional de estructuras antisentido de UC41 a pacientes con cáncer de próstata será un método muy eficiente para administrar un gen terapéuticamente efectivo que contrarreste la enfermedad clínica. De forma similar, se puede dirigir la quimioterapia o la radioterapia a una región concreta afectada del cuerpo del sujeto. Alternativamente, la administración sistémica de la estructura de expresión y/o del agente puede resultar apropiada en determinadas circunstancias, por ejemplo, cuando se ha producido una metástasis extensa.
- 45 Además de combinar terapias dirigidas al UC41 con quimioterapias y radioterapias, también se contempla que la combinación con otras terapias genéticas resultará beneficiosa. Por ejemplo, la focalización simultánea de las terapias hacia UC41 y p53 puede producir un tratamiento mejorado contra el cáncer. Cualquier otro gen relacionado con los tumores existente se podrá dirigir de esta manera, por ejemplo el p21, Rb, APC, DCC, NF-1, NF-2, pl6, FHTT, WT-1, MEN-I, MEN-O, VHL, FCC, MCC, *ras*, *myc*, *neu*, *raf*, *erb*, *src.fins*, *jun*, *trie*, *ret*, *gsp*, *hst*, *bcl* y *abl*.
- 50

4.9.4 Detección de moduladores de UC41

Las células que presentan una expresión de UC41 elevada pueden ser detectadas para identificar efectores de la expresión de UC41. Por tanto, en determinadas realizaciones de la invención, se proporcionan métodos para detectar moduladores de la expresión de UC41. La expresión de UC41, a su vez, puede examinarse a través de un ensayo Northern blot o un ensayo slot blot de los productos del RNA del gen, inmunoensayo Western blot, análisis de los productos proteicos del gen o a través de otras técnicas estándar descritas en el presente. Los compuestos que modulan la expresión de UC41 se pueden detectar por su efecto sobre las cantidades de esos productos genéticos proteicos o del RNA presentes en una determinada línea de células o muestra de tejido.

Los métodos de detección pueden emplear las células diana como células adherentes sobre una placa de cultivo, como parte de una biomatriz de alginato, en cultivo de suspensión o en cualquier otra forma que permita la expresión del polipéptido o ácido nucleico a controlar. Estas células se utilizan posteriormente como reactivos para detectar bibliotecas de pequeñas moléculas y péptidos para identificar moduladores de la función de UC41.

incluyendo la transcripción de genes; la estabilidad del mRNA; la traslación, modificaciones postraslacionales, como el procesamiento proteolítico, la formación de enlaces de disulfuro, la amidación y glicosilación; y la localización subcelular. Los métodos de detección controlarán la expresión de estos productos genéticos en ausencia de la sustancia candidata y comparando estos resultados con el ensayo realizado en presencia de sustancias candidatas.

Se contempla que esta técnica de detección resultará útil para la identificación general de un compuesto que servirá para los fines de reducir, inhibir o anular de otro modo la expresión de UC41. Estos compuestos serán útiles en el tratamiento del cáncer de próstata. En estas realizaciones, la invención actual está dirigida a un método para determinar la capacidad de una sustancia candidata para inhibir la expresión de UC41 según la reivindicación 1. Por lo general, el método incluye los pasos siguientes:

- (a) proporcionar al menos una célula de expresión de UC41;
- (b) poner en contacto dicha célula con la mencionada sustancia candidata;
- (c) medir el nivel de expresión de UC41 en la mencionada célula; y
- (d) compara la expresión de UC41 de la célula en el paso (c) con la expresión de UC41 de la célula en el paso (a).

Para identificar una sustancia candidata capaz de inhibir la expresión de UC41 en el anterior ensayo, se medirán o determinarán niveles de expresión de UC41 en una línea de células apropiada en ausencia de la sustancia candidata añadida. Posteriormente se añadirá la sustancia candidata a la célula y se determinará el nivel de expresión de UC41 en presencia de la sustancia candidata. Una sustancia candidata que reduce la expresión de UC41 con respecto al nivel de expresión en su ausencia es indicativa de una sustancia candidata reguladora de la expresión de UC41.

Para los fines del presente, el término "sustancia candidata" se refiere a cualquier molécula capaz de modular la expresión de UC41. La sustancia candidata puede ser una proteína o fragmento de la misma, un inhibidor de una molécula pequeña o incluso una molécula de ácido nucleico. Puede darse el caso de que los compuestos farmacológicos más útiles para la identificación a través de la aplicación del ensayo de detección sean compuestos estructuralmente relacionados con otros moduladores de la expresión conocidos. Los compuestos activos pueden incluir fragmentos o partes de compuestos naturalmente presentes o pueden encontrarse solamente como combinaciones activas de compuestos conocidos que son de otro modo inactivos. No obstante, antes de testar estos compuestos en modelos humanos o animales, probablemente será necesario testar diversos candidatos para determinar cuáles tienen potencial.

Por consiguiente, los compuestos activos pueden incluir fragmentos o partes de compuestos naturalmente presentes o pueden encontrarse solamente como combinaciones activas de compuestos conocidos que son de otro modo inactivos. Así pues, la presente invención proporciona ensayos de detección para identificar agentes que estimulan o inhiben la expresión celular de UC41. Se propone que se pueden testar compuestos aislados de fuentes naturales, como animales, bacterias, hongos, plantas, incluyendo las hojas y la corteza, y muestras marinas, como candidatos para la presencia de agentes farmacéuticos potencialmente útiles. Se entenderá que los agentes farmacéuticos a detectar también podrían obtenerse o sintetizarse a partir de composiciones químicas o compuestos producidos por el hombre. Por tanto, se entiende que la sustancia candidata identificada por la presente invención puede ser inhibidores de moléculas pequeñas, polinucleótidos, polipéptidos o cualquier otro compuesto que se pueda diseñar

mediante un diseño racional de fármacos a partir de reguladores conocidos de la expresión genética, así como agentes conocidos para el tratamiento terapéutico del cáncer de próstata.

5 Los ensayos de detección de sustancias candidatas son fáciles de elaborar y realizar. Por tanto, al realizar un ensayo para identificar un compuesto regulador de UC41 candidato, tras obtener una línea de células que expresa UC41, se añadirá una sustancia candidata a la célula, en condiciones que permitan una expresión mensurable.

"Cantidades efectivas" en determinadas circunstancias son aquellas cantidades efectivas para estimular de forma reproducible la expresión de la célula en comparación con sus niveles normales. Se emplearán compuestos que logran unos cambios apropiados significativos en la expresión de UC41.

10 Los cambios significativos en la expresión de UC41 están representados por un descenso en la expresión de al menos el 30%-40% aproximadamente, y más preferiblemente, por descensos de al menos el 50%, siendo posibles valores superiores.

Por supuesto, se entenderá que todos los métodos de detección de la presente divulgación son útiles por sí mismos, independientemente del hecho de que no se puedan encontrar candidatos efectivos. La divulgación proporciona métodos para detectar estos candidatos, no solamente métodos para buscarlos.

15 5.0 EJEMPLOS

20 Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar la realización preferible de la divulgación. Cualquier realización que no se enmarque en el ámbito de aplicación de las reivindicaciones se proporciona únicamente con fines comparativos. Aquellos versados en la materia apreciarán que las técnicas divulgadas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por los inventores para que funcionen bien en la práctica de la invención, por lo que se podrá considerar que constituyen los modos preferibles para su práctica. No obstante, aquellos versados en la materia apreciarán, a la luz de la presente divulgación, que se pueden introducir muchos cambios en las realizaciones concretas divulgadas, obteniendo unos resultados iguales o similares.

5.1 Materiales y métodos

5.1.1 Adquisición de tejidos

25 Los tejidos de la próstata normal, la hiperplasia prostática benigna (BPH), el cáncer de próstata (CaP) y el cáncer de próstata con metástasis procedían de prostatectomías radicales. Los xenoinjertos eran de dos líneas de células, Lu23 y Lu35, de ratón desnudo. Todos los tejidos fueron procesados de inmediato para el aislamiento de RNA o congelados en nitrógeno líquido y posteriormente almacenados a -80 °C para su posterior uso. Las líneas de células del cáncer de próstata LNCaP, PC-3 and DU1145 se mantuvieron en medio RPMI1640.

30 5.1.2 Visualización diferenciada

35 Se empleó un método de visualización diferenciada modificado (Liang y Pardee, 1992; An *et al*, 1995) para identificar el UC41 como un gen regulado al alza en el cáncer de próstata. El RNA total fue aislado de tejidos de cáncer de próstata y de próstata normal congelados de acuerdo con Chomczynski y Sacchi (1987). El RNA (10 ug) de cada tejido fue tratado con 5 unidades de DNasa I libre de RNasa (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD) en presencia de 20 mM de Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KC1, 2 mM MgCl₂ y 20 unidades de inhibidor de RNasa (Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN). Tras la extracción con fenol/cloroformo y el precipitado con etanol, el RNA fue disuelto de nuevo en H₂O tratada con DEPC.

40 Se procedió a la transcripción inversa de un µg de cada muestra de RNA en cADN, utilizando 20 hexámeros aleatorios y transcriptasa inversa de M-MLV (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD), siguiendo las instrucciones de fabricante. La mezcla de reacción contenía 50 mM de Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KC1, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 500 µM dNTP, 2 um de hexámeros aleatorios 400 U de transcriptasa inversa de M-MLV. Se realizó la PCRTM con dos cebadores 10-mer arbitrarios.

Cebadores arbitrarios empleados para identificar UC41:

45 5' CTAGTGATTA 3' SEQ. ID. Nº 6
5' CTAGTGATTA 3' SEQ. ID. Nº 7

Se realizó la PCRTM en solución tampón IX PCRTM (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD), 50 µM dNTPs, 0.2 µM de cebador(es) arbitrario(s), 1/20 de volumen (1 µl) del cADN y 1 U de Taq ADN polimerasa (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD) en un volumen final de 20 µl. Los parámetros de amplificación incluían 40 ciclos de reacción con

30 seg. de desnaturalización a 94 °C, 1 min. 30 seg. de anillado a 38 °C y 1 min. de extensión a 72 °C. Se realizó una extensión final a 72°C durante 15 min. Posteriormente los productos de la PCR™ fueron separados en un gel de metáfora de agarosa al 3% (FMC BioProducts, Rockland, ME) con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio y se identificaron las bandas positivas bajo luz ultravioleta. Las bandas positivas se cortaron con una cuchilla, se purificaron en resina Qiaex (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se clonaron directamente en un plásmido empleando el sistema de clonación TA (pGEM-T system, Promega, Madison, WI). La expresión diferencial de las bandas positivas se confirmó mediante RT-PCR™ cuantitativa relativa.

5.13 Análisis de secuencias y detección de bibliotecas de cADN prostático

Se realizó una sonda etiquetada con [α -³²P]-dATP mediante etiquetado aleatorio (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD) de un fragmento EST de 183 bp de UC41 (identificado como SEQ. ID. N°23 en la Patente estadounidense nº 5.882.864). Este fragmento corresponde a las bases 1323-1500 de la SEQ. ID. N° 1. Se colocó una biblioteca de cADN prostático humano normal de λ gt11 (Clontech) en placas por duplicado y se analizó conforme al manual del producto. La hibridación de la biblioteca de las placas se realizó a 68°C hasta el día siguiente en una solución ExpressHyb (Clontech, Palo Alto, CA). Los filtros se lavaron dos veces en 2X SSC, 0,05% SDS a 37°C, y después una vez en 0.1X SSC, 0.1% SDS a 50°C. El filtro etiquetado fue expuesto a una película XAR-5 (Kodak, Rochester, NY) a -70°C.

De unas 3×10^{-5} placas, se aislaron dos clones positivos independientes tras tres rondas de ensayo. Los elementos insertados de los dos clones fueron reamplificados y subclonados en el vector de secuenciación pCR2-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). La secuencia se determinó mediante secuenciación por ciclos con cebadores directos e inversos de M13 y se analizó con el software Sequencher (Gene Codes). La secuencia de cADN completa identificada para UC41 se presenta en la SEQ. ID. N° 1. La longitud completa del fragmento de cADN (SEQ. ID. N° 1) insertada en el vector pCR2-TOPO se identifica en el presente como pCR TOPO-UC41. La secuencia generada fue analizada para la predicción del marco de lectura abierto, el sitio de inicio de la traslación, el péptido de señalización, la región transmembrana y la potencial modificación del dominio.

5.1.4 Análisis Northern blot y dot blot

La sonda empleada para realizar los ensayos Northern blot y dot blot consistía en un fragmento de ADN de 697 bp obtenido de pCR TOPO-UC41 mediante digestión con *Sph* I y *Pst* I y etiquetada con [α -³²P]-dATP empleando un kit de marcado de ADN del cebador aleatorio (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD). El fragmento *Sph* I-*Pst* I corresponde a las bases 157 a 854 de la SEQ. ID. N° 1. Los filtros de Northern blot para múltiples tejidos (incluyendo ocho tejidos de adulto normales) y maestros para RNA humano (incluyendo 43 tejidos de adulto y 7 tejidos fetales) (Clontech, Palo Alto, CA) que contenían 2 µg o 89-514 µg, respectivamente, de poli A+ RNA normalizado por línea o punto fueron hibridados con una sonda etiquetada con [α -³²P]-dATP descrita anteriormente y expuestos a una película XAR-5 (Kodak, Rochester, NY) a -70°C durante tres días.

5.1.5 Hibridación in situ

Para generar la sonda para estudios de hibridación *in situ*, el cADN de UC41 (SEQ. ID. N° 1) fue amplificado mediante PCR™ empleando los siguientes cebadores durante 30 ciclos a 94°C durante 30 seg., 58°C durante 1 min, 72°C durante 1 min, cada uno, y una extensión final de 5 min. a 72 °C.

Cebador directo (en la posición 1319 de la SEQ. ID. N°: 1)

5'-AAAACGATATCATGCTTTCTCATCTCTCC-3' (SEQ. ID. N° 8)

Cebador inverso (en la posición 1694 de la SEQ. ID. N°: 1)

5'-CAATTGCGGCCGCTCTATCAGCCTCTTTGGAG-3' (SEQ. ID. N° 9)

El producto amplificado de la PCR™ fue posteriormente clonado en el vector pGEM-T para crear el plásmido pGEMT-UC41. Las sondas de RNA sentido y antisentido etiquetadas con digoxigenina-dUTP fueron sintetizadas a partir de 1 µg de plásmido linearizado pGEMT-UC41 (digerido con *Nco* I o *Eco* RV) en una reacción de transcripción *in vitro* estándar, empleando los promotores T7 y SP6 y un kit de etiquetado de RNA DIG (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN).

La hibridación *in situ* se realizó con un sistema *in situ* automático Genii (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Las secciones (5 µm) de tejido colocado en parafina y fijado con formalina se montaron en portaobjetos Proma plus. Posteriormente se eliminó la cera de los portaobjetos a 65 °C durante 2 horas y fueron rehidratados. Antes de la hibridación, las secciones fueron digeridas con un cóctel de proteinasa I durante 12 minutos a 37°C. Después se

aplicaron 10 µg de la sonda sentido o antisentido del tampón de hibridación, en un volumen de 70 µl, a las secciones, se desnaturalizaron a 65 °C y posteriormente se incubaron a 42 °C durante 360 minutos. Tras el lavado secuencial con tampón de 2X, IX y 0.1XSSC, se detectó la señal específica empleando anticuerpo de ratón anti-digoxigenina, seguido de un anticuerpo anti-ratón conjugado de biotina y estreptavidina-peroxidasa de rábano, y se desarrollaron con DAB H₂O₂.

5.1.6 RT-PCR™

Se realizaron microdisecciones de tejidos de cáncer de próstata y de próstata normal, conforme a las directrices del teñido con hematoxilina y eosina (H&E) en tejidos colocados en OCT (compuesto Optimal Cutting Temperature), Miles, Inc., Elkhart IN) tras prostatectomías radicales. El RNA total fue aislado de los correspondientes tejidos de cáncer de próstata y de próstata normal, líneas de células del cáncer de próstata y xenoinjertos con un kit STAT 60 (Tel-Test, Friendswood, TX) según las instrucciones del fabricante. Se procedió a la transcripción inversa de un µg de RNA total en cADN con cebadores aleatorios de hexámeros y un kit SuperTrascriptase II (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD). Se amplificó un microlitro de cada cADN resultante mediante PCR™ durante 28 ciclos a 94°C durante 30 seg., 58°C durante 1 min., 72°C durante 1 min, empleando los cebadores de microglobina β₂ o específicos de UC 41 que se identifican a continuación.

Cebador directo de UC41 (posición 169 de la SEQ. ID. Nº: 1)

5'-CAAATAGCAAGCCCTGCCCACTCA-3' (SEQ. ID. Nº: 10)

Cebador inverso de UC41 (posición 503 de la SEQ. ID. Nº: 1)

5'-CTCCTAATCTCACCCCTTCCGCTAT-3' (SEQ. ID. Nº 11)

βCebador directo de β₂ microglobina

5'-CACGTCATCCAGCAGAGAATGGAAAGTC-3' (SEQ. ID. Nº: 12)

βCebador inverso de β₂ microglobina

5'-GAGAATAGGTTGTAGTTGTAGAACCAGT-3' (SEQ. ID. Nº: 13)

5.1.7 Localización cromosómica del gen UC41 mediante FISH

La localización cromosómica de UC41 fue identificada mediante FISH empleando el procedimiento de Heng *et al.* (1992). Los linfocitos aislados de la sangre humana fueron cultivados en (PHA) a 37°C durante 68-72 horas. Los cultivos de linfocitos fueron posteriormente tratados con bromodesoxiuridina (BrdU, 0.18 mg/ml, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) para sincronizar la población de células. Las células fueron lavadas con medio libre de suero para liberar el bloqueo del ciclo celular y recultivadas a 37°C durante 6 horas en MEM con timidina (2,5 µg/ml, Sigma).

Las células fueron recogidas y se colocaron en portaobjetos mediante procedimientos estándar, incluyendo tratamiento hipotónico y fijación seguida de secado con aire. Los portaobjetos se cocieron a 55 °C durante 1 hora. Después del tratamiento con Rnasa, los portaobjetos fueron desnaturalizados en un 70% de formamida en 2X SSC durante 2 min. a 70°C, seguida de deshidratación con etanol. Se biotiniló una sonda de cADN de UC41 de 0,9 kb con dATP durante 1 hora a 15 °C, empleando un kit de marcado BioNick (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD). La sonda se preparó mediante digestión con *Hpa* I y *Nco* I y corresponde a las bases 870 a 1840 de la SEQ. ID. Nº 1.

La sonda etiquetada fue desnaturalizada a 75 °C durante 5 minutos en una solución de hibridación que contenía un 50% de formamida, un 10% de sulfato de dextrano y ADN Cot I humano. La sonda desnaturalizada se añadió a los portaobjetos y se permitió que se hibridase con el ADN cromosómico hasta el día siguiente. Posteriormente los portaobjetos fueron lavados, detectados y amplificados mediante procedimientos estándar. Las señales FISH y el patrón de bandas DAPI fueron registrados por separado mediante fotografía secuencial del mismo campo microscópico. La asignación de los datos de mapeo FISH a las bandas cromosómicas se consiguió superponiendo las señales FISH sobre los cromosomas de bandas DAPI.

Se empleó un panel Stanford G3 (Research Genetics, Huntsville, AL) para determinar el vínculo de UC41 con marcadores microsatélite conocidos. El panel G3 contenía 83 híbridos de células de hámster-humano reducidas por

radiación con una resolución estimada de unos 500 kb. Se realizó la PCR™ con los siguientes cebadores específicos de UC41.

Cebador directo (en la posición 1191 de la SEQ. ID. Nº 1)

5'-CTGCCAACTTCCTCTCTATGC-3' (SEQ. ID. Nº: 14)

5 Cebador inverso (en la posición 1707 de la SEQ. ID. Nº: 1)

5'-GTCCTCATCTATCAGCCTCTTTG-3' (SEQ. ID. Nº: 15)

Se realizó el ciclo térmico durante 35 ciclos a 94°C durante 30 seg., 56°C durante 1 min., 72°C durante 1 min., seguido por la extensión a 72°C durante 10 min. El producto de la PCR™ se resolvió en un 1 % de gel de agarosa y el panel G3 de UC41 se ordenó utilizando el programa Rfl-MAP del servidor RH (Universidad de Washington).

10 5.2 Ejemplo 1: Identificación de UC41 como un gen sobreexpresado en el cáncer de próstata mediante visualización diferenciada

15 Se empleó un método de visualización diferenciada de mRNA a base de gel de agarosa modificado para identificar genes expresados de forma diferenciada en el tejido del cáncer de próstata. UC41 fue identificado como un gen regulado al alza de forma muy significativa en el cáncer de próstata. Como se muestra en la FIG 1 (panel A), se observó una banda fuerte (UC41) en los tres tejidos de cáncer de próstata empleados para el estudio de visualización diferenciada, mientras que la intensidad de la banda de UC41 era muy reducida en los cuatro tejidos normales testados.

20 El UC41 fue separado, purificado y clonado directamente en el plásmido pGEM-T mediante clonación de TA. El clon del cADN de UC41 fue secuenciado mediante técnicas estándar descritas anteriormente. El fragmento EST de 183 bp de UC41 resultante (identificado como SEQ. ID. Nº 12 en la Patente estadounidense nº 5.882.864) corresponde a las bases 1323-1500 de la SEQ. ID. Nº: 1.

25 Utilizando los datos de esta secuencia, se diseñaron cebadores directos e inversos para UC41 (SEQ. ID. Nº 10 y SEQ. ID. Nº 11) y se emplearon en un estudio de RT-PCR™ cuantitativo relativo, como se ha descrito anteriormente, para confirmar la regulación al alza de este gen en el cáncer de próstata. Como se muestra en la FIG. 1, panel B, la expresión de UC41 se confirmó como significativamente regulada al alza en los seis tejidos de cáncer de próstata testados, mientras que la expresión era muy baja en los tejidos prostáticos normales. Estudios separados confirmaron que la expresión de UC41 es significativamente elevada en el cáncer de próstata en comparación con la BPH. De este modo, la sobreexpresión de UC41 parece diagnosticar tumores de próstata malignos. La expresión de UC41 se comparó en muestras emparejadas de tejidos de cáncer de próstata y de próstata normal tomados de los mismos sujetos, determinada mediante RT-PCR™ semicuantitativa.

35 Las ocho muestras muestran una expresión aumentada de UC41 en tejidos de cáncer de próstata, con diferentes grados de sobreexpresión observados en sujetos individuales (FIG. 2). La expresión de UC41 se examinó en tres líneas de células del cáncer de próstata, LNCaP, PC-3, DU145 y dos xenoinjertos CaP, Lu 23 y Lu 35. Lu 23 expresaba un elevado nivel de UC41, mientras que Lu 35 mostraba una expresión relativamente baja y las tres líneas de células del cáncer de próstata eran prácticamente negativas para la expresión de UC41 (FIG. 2).

5.3 Ejemplo 2: Aislamiento de un cADN de longitud completa de UC41

40 El fragmento de UC41 de 183 bp identificado en el Ejemplo 1 se empleó como sonda para estudiar una biblioteca de cADN de tejido prostático normal. Este estudio produjo seis clones positivos independientes en filtros duplicados (que contenían más de 3×10^6 clones recombinantes). Estos seis clones aislados fueron sometidos a un posterior estudio. Dos de estos clones produjeron fuertes señales positivas tras la hibridación repetitiva. Los elementos insertados de estos dos clones fueron amplificados con cebadores M13 adyacentes y subclonados en el vector Top (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Se determinaron las secuencias de ADN de los dos extremos de los elementos insertados y se descubrió que se solapaban entre sí y con el fragmento de UC41 identificado mediante visualización diferenciada.

45 El cADN de longitud completa para el gen UC41 fue clonado mediante una combinación de métodos de detección en una biblioteca de cADN y (Rapid Cloning of cADN Ends) (Frohman, 1990). la secuencia de cADN completa de 1934 bp identificada se muestra en la SEQ. ID. Nº 1 (FIG. 9).

Los análisis de traslación generados por bioinformática del cADN indicaron un ORF (marco de lectura abierto) de 125 aminoácidos (SEQ. ID. Nº 2) con un codón de inicio de ATG en el 1320 de la SEQ. ID. Nº y un codón de terminación en el bp 1695 de la SEQ. ID. Nº 1. El EST de 183 bp identificado en el Ejemplo 1 comienza inmediatamente después del codón de inicio y finaliza aproximadamente a mitad de camino hacia el ORF. Las posiciones 61-65 se denominan en el presente SEQ. ID. Nº 5.

La proteína traducida tiene una masa molecular calculada de 13.7 kDa y un pH isoelectrónico de 10.48. Dos potenciales sitios de miristoilación se encuentran en los residuos 59-64 (GQVSTR; SEQ. ID. Nº 17) y 80-85 (GISNSG; SEQ. ID. Nº 18) de la SEQ. ID. Nº 2. Tres sitios de fosforilación de proteína quinasa C putativos se encuentran en los residuos 27-29 (TLR), 62-64 (STR) y 84-86 (SGR) de la SEQ. ID. Nº 2. Una región de hidropatía de la SEQ. ID. Nº 2 produjo una región de extremo N-terminal ligeramente hidrófilo, que puede servir como péptido de señal (residuos 2-24 de la SEQ. ID. Nº 2) y una zona de extremo C-terminal fuertemente hidrófoba, que tiene la característica de un dominio transmembrana (residuos 99-121 de la SEQ. ID. Nº 2). Las extensas búsquedas informáticas de homologías realizadas en GenBank, ECM, y bancos de secuencias de Suiza no encontraron ninguna secuencia de nucleótido/aminoácidos conocida que presente homología con el cADN de UC41 o secuencias de aminoácidos deducidas.

5.4 Ejemplo 3: Hibridación in situ

Se realizaron estudios para investigar la expresión de UC41 y localizar el mRNA de UC41 en el cáncer de próstata colocado en parafina y fijado con formalina y el cáncer de próstata con metástasis en los nódulos linfáticos y los huesos, en comparación con el tejido prostático normal. La FIG. 3 muestra una comparación del tñido de UC41 en el tejido del cáncer de próstata en comparación con la próstata normal. Se localizó un nivel significativo de UC41 en el tejido de adenocarcinoma de próstata, mientras que solamente se detectaron unos niveles mínimos de mRNA de UC41 en las muestras adyacentes de células epiteliales prostáticas benignas y normales (FIG. 3). La expresión de UC41 en tejido prostático normal parece estar localizada en las células epiteliales lumbinales, preferiblemente en las células basales lumbinales. (FIG. 3) Las células de cáncer de próstata con metástasis en los nódulos linfáticos mostraron un tñido muy fuerte con una sonda de mRNA de UC41 (FIG. 4), mientras que los nódulos linfáticos normales no mostraban ningún tñido detectable (FIG. 4). Resultados similares se observaron en las células de cáncer de próstata con metástasis en la médula ósea, en comparación con la médula ósea normal (FIG. 5).

5.5 Ejemplo 4: Expresión específica de UC41 en el tejido prostático

La expresión específica del tejido de UC41 se examinó mediante análisis Northern blot con mRNA del bazo, del timo, de la próstata, de los testículos, de los ovarios, del intestino delgado, del colon y de los leucocitos de la sangre periférica (FIG. 6). Se observó una fuerte señal de hibridación específicamente en el tejido prostático (FIG. 6). Los resultados en la próstata son coherentes con la existencia de dos diferentes variantes separadas del gen UC41, con una importante migración de la banda a unos 1,5 kb y una banda menor aproximadamente a 2,1 kb (FIG. 6). Estos resultados indicaron que la expresión del gen UC41 es específica del tejido prostático.

La expresión prostática específica de UC41 se confirmó mediante hibridación dot blot, empleando un panel expandido de muestras de RNA de 50 diferentes tejidos humanos adultos y fetales (FIG. 7). Una vez más, se observó una fuerte señal de hibridación solamente en el RNA prostático (FIG. 7) con una cantidad muy pequeña de hibridación detectada en el RNA de la vejiga (FIG. 7).

5.6 Ejemplo 5: Localización cromosómica de UC41

El lugar cromosómico de UC41 fue identificado mediante comparación de la hibridación FISH de UC41 (FIG. 8, panel A) y el tñido DAPI (FIG. 8, panel B). Basándose en esta comparación, se asignó UC41 al brazo largo del cromosoma 3. La posición detallada de UC41 se determinó también basándose en un resumen de datos de 10 diferentes comparaciones FISH/DAPI (FIG. 8, elemento insertado de la derecha), que realizaron un mapeo del gen hasta 3q22-23. Tanto el mapeo FISH (FIG. 8) como la hibridación Southern blot de ADN genómico humano indican que el gen UC41 existe como una copia única.

El UC41 fue incluido en el panel híbrido de radiación G3 desarrollado en Stanford y analizado con el programa RH-MAP (Universidad de Washington), como se ha descrito anteriormente. El análisis de dos puntos ordenó el UC41 con el marcador de microsatélite D3S1541, con una distancia de 11 cR (unos 250 kb).

Aquellos versados en la materia reconocerán que el gen y los productos genéticos (RNA y proteínas) del UC41 están incluidos dentro del ámbito de la divulgación aquí descrita. Aquellos versados en la materia reconocerán también que el diagnóstico y el pronóstico del cáncer de próstata mediante la detección de ácido nucleico o productos proteicos de este gen están incluidos en el ámbito de aplicación de la divulgación.

Todas las composiciones y métodos divulgados y reivindicados en el presente se pueden realizar y ejecutar sin experimentación indebida, a la luz de la presente divulgación. A pesar de que las composiciones y los métodos de la presente invención se han descrito en términos de realizaciones preferibles, aquellos versados en la materia apreciarán que se pueden aplicar variaciones a la composición, los métodos y los pasos o la secuencia de pasos del método aquí descrito.

Más concretamente, se apreciará que determinados agentes que están química y físicamente relacionados pueden ser sustituidos por los agentes aquí descritos, obteniéndose unos resultados iguales o similares. Todos estos sustitutos y modificaciones similares evidentes para aquellos versados en la materia se consideran dentro del ámbito de aplicación de la invención definida por las reivindicaciones adjuntas.

6.0 REFERENCIAS

- Alcaraz et al, Cancer Res., 55:3998-4002, 1994.
 Allhoff et al, World J. Urol, 7:12-16, 1989.
 An et al, Proc. Amer. Assn. Cane. Res., 36:82, 1995.
 An et al. Molec. Urol, 2: 305-309, 1998.
- Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1988.
- Babian et al, J. Urol, 156:432-437, 1996.
 Badalament et al, J. Urol, 156: 1375-1380, 1996.
 Baichwal y Sugden, en: Gene Transfer, Kucherlapati (Ed.), Plenum Press, New York, pp 117-148, 1986.
- Bangham et al, J. Mol Biol 13: 238-252, 1965.
 Barinaga, Science, 21Y. 1233, 1996.
 Bedzyk et al, J. Biol. Chem., 265:18615, 1990
 Bell et al, "Gynecological and Genitourinary Tumors," en: Diagnostic Immunopathology, Colvin, Bhan yd McCluskey (Eds.), 2ª edición, Ch. 31, Raven Press, New York, pp 579-597, 1995.
- Bellus, J. Macromol Sci. Pure Appl Chem., A31 (1): 1355-1376, 1994.
 Benvenisty y Neshif, Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 83:9551-9555. 1986.
 Bittner et al. Methods in Enzymol, 153:516-544, 1987.
 Bookstein et al. Science, 247:712-715,1990a.
 Bookstein et al, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 87:7762-7767, 1990b.
- Bova et al. Cancer Res., 53:3869-3873, 1993.
 Brawn et al, The Prostate, 28: 295-299, 1996.
 Campbell, en: Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Burden and Von Knippenberg (Eds.), Vol. 13:75-83, Elsevier, Amsterdam, 1984.
 Capaldi et al, Biochem. Biophys. Res. Comm., 76:425, 1977.
- Carter y Coffey, en: Prostate Cancer: The Second Tokyo Symposium, J.P. Karr y H. Yamanak (Eds.). Elsevier, New York, pp 19-27, 1989.
 Carter y Coffey, Prostate, 16:39-48,1990.
 Carter et al, Proc. Natl Acad. Sci USA, 87:8751-8755, 1990.
 Carter et al, Proc. Natl Acad. Sci USA 93: 749-753, 1996.
- Carter et al, J. Urol., 157:2206-2209,1997. Cech et al. Cell, 27:487-496, 1981.
 Chang et al, Hepatology, 14:124A, 1991.
 Chaudhary et al, Proc. Natl Acad. Sci, 87:9491,1990
 Chen y Okayama, Mol. Cell Biol., 7:2745-2752, 1987.
 Chen et al. Clin. Chem., 41:273-282, 1995a.
- Chen et al, Proc. Am. Urol. Assn., 153:267A. 1995.
 Chinault y Carbon, "Overlap Hybridization Screening: Isolation and Characterization of Overlapping ADN Fragments Surrounding the LEU2 Gene on Yeast Chromosome m," Gene, 5:111-126, 1979.
 Chomczynski y Sacchi, Anal Biochem., 162:156-159, 1987.
 Christensson et al, J. Urol, 150:100-105, 1993.
- Coffin, en: Virology, Fields et al. (Eds.), Raven Press, New York, pp 1437-1500, 1990.
 Colberre-Garapin et al, J. Mol Biol, 150:1, 1981.
 Colvin et al. Diagnostic Immunopathology, 2ª edición. Raven Press, New York, 1995.
 Cooner et al, J. Urol, 143:1146-1154, 1990.
 Couch et al. Am. Rev. Resp. Dis., 88:394-403, 1963.
- Coupar et al. Gene, 68:1-10, 1988.
 Culver et al. Science, 256:1550-1552,1992.
 Davey et al, EPO No. 329 822.
 Deamer y Uster, "Liposome Preparation: Methods and Mechanisms," en: Liposomes. M. Ostro (Ed.), 1983. Diamond et al, J. Urol, 128: 729-734,1982.
- Donahue et al, J. Biol. Chem., 269:8604-8609, 1994.

- Dong et al. Science, 268:884-886, 1995.
 Dubensky et al, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 81:7529-7533, 1984.
 Dumont et al., J. Immunol, 152:992-1003, 1994.
 Elledge et al., Cancer Res. 54:3752-3757, 1994
 5 Solicitud de patente europea EPO No. 320 308 Fearon et al.
 Science, 247:47-56, 1990.
 Fechheimer et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:8463-8467, 1987.
 Forster y Symons, Cell, 49:211-220, 1987.
 Fraley et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3348-3352, 1979.
 10 Friedmann, Science, 244:1275-1281, 1989.
 Freifelder, en: Physical Biochemistry Applications to Biochemistry and Molecular Biology. 2ª ed., Wm. Freeman and
 Co., New York, NY, 1982.
 Frohman, en: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, NY, 1990.
 Geffer et al., Somatic Cell Genet., 3:231-236, 1977.
 15 Gerlach et al. Nature (London), 328:802-805, 1987.
 Ghosh-Choudhury et al, EMBO J., 6:1733-1739, 1987.
 Gingeras et al, Solicitud PCT WO 88/10315.
 Ghosh y Bachhawat, en: Liver Diseases. Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands,
 Wu et al. (Eds.), Marcel Dekker. New York, pp 87-104, 1991.
 20 Goding, en: Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 2ª ed. Academic Press, Orlando, FL, pp 60- 61, 65-
 66, 71 -74, 1986.
 Gomez-Foix et al, J. Biol. Chem., 267:25129-25134, 1992.
 Gopal, Mol Cell Biol, 5:1188-1190. 1985.
 Graham et al, J. Gen. Virol, 36:59-72, 1977.
 25 Graham y van der Eb, Virology, 52:456-467, 1973.
 Graham y Prevec, en: Methods in Molecular Biology: Gene Transfer and Expression Protocols 7, E.J. Murray (Ed),
 Humana Press, Clifton, NJ, pp 205-225. 1991.
 Gregoriadis (ed.). En: Drug Carriers in Biology and Medicine, pp 287-341, 1979.
 Grunhaus y Horwitz, Sem. Virol., 3:237-252, 1992.
 30 Harland y Weintraub, J. Cell Biol., 101:1094-1099, 1985.
 Harris et al., J. Urol., 157:1740-1743, 1997.
 Heng et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 89: 9509-9513, 1992.
 Hermonat y Muzycska, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 81:6466-6470, 1984.
 Hersdorffer et al., ADN Cell Biol, 9:713-723, 1990.
 35 Herz y Gerard, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 90:2812-2816, 1993.
 Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg., 7:149, 1968.
 Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255:2073, 1980.
 Holland et al. Biochemistry, 17:4900, 1978.
 40 Horoszewicz, Kawinski y Murphy, Anticancer Res., 7:927-936, 1987.
 Horwich, et al, J. Virol, 64:642-650, 1990.
 Huang et al. Prostate, 23: 201-212, 1993.
 Innis et al. En: PCR Protocols, Academic Press, Inc., San Diego CA, 1990.
 Inouye et al, Nucl Acids Res., 13:3101-3109, 1985.
 Isaacs et al, Cancer Res., 51:4716-4720, 1991.
 45 Isaacs et al, Sent. Oncol. ,21:1-18, 1994.
 Israeli et al. Cancer Res., 54:1807-1811, 1994.
 Jacobson et al. JAMA, 274:1445-1449, 1995.
 Johnson et al., en: Biotechnology and Pharmacy, Pezzuto et al., (Eds.), Chapman and Hall, New York, 1993.
 Jones, Genetics, 85:12, 1977.
 50 Jones y Shenk, Cell, 13:181-188, 1-978.
 Joyce, Nature, 338:217-244, 1989.
 Kaneda et al. Science, 243:375-378, 1989.
 Kato et al, J. Biol Chem., 266:3361-3364, 1991.
 Kim y Cech. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:8788-8792, 1987.
 55 Kingsman et al, Gene, 7:141, 1979.
 Klein et al, Nature. 327:70-73. 1987.
 Kohler y Milstein, Nature, 256:495-497, 1975.
 Kohler y Milstein, Eur. J. Immunol., 6:511-519, 1976.
 Kwoh et al, Proc. Nat. Acad. Sci USA, 86:1173, 1989.
 60 Landis et al, CA Cancer J. Clin., 48: 6-29, 1998.
 Le Gal La Salle et al, Science, 259:988-990, 1993.
 Levrero et al, Gene, 101:195-202, 1991.
 Liang y Pardee, Science, 257:967-971, 1992.
 Liang y Pardee, Patente estadounidense 5.262.311, 1993.

- Liang et al. *Cancer Res.*, 52:6966-6968, 1992.
 Lifton, *Science*, 272:676, 1996.
 Lilja et al, *Clin. Chem.*, 37:1618-1625, 1991.
 Lithrup et al. *Cancer*, 74:3146-3150, 1994.
 5 Lowy et al. *Cell*, 22:817, 1980.
 Macoska et al. *Cancer Res.*, 54:3824-3830, 1994.
 Mann et al. *Cell*, 33:153-159, 1983.
 Markowitz et al., *J. Virol.* 62:1120-1124, 1988.
 10 Marley et al, *Urology*, 4S(6A): 16-22, 1996.
 McCormack et al. *Urology*, 45:729-744, 1995.
 Michel y Westhof, *J. Mol Biol.* 216:585-610, 1990.
 Miki et al, *Science*. 266:66-71, 1994.
 Miller et al, *Solicitud PCT*, WO 89/06700.
 Mok et al, *Gynecol. Oncol.*, 52:247-252. 1994.
 15 Morahan et al, *Science* 272:1811, 1996.
 Mulligan et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 78:2072, 1981.
 Mulligan, *Science*, 260:926-932, 1993.
 Murphy et al. *Cancer*, 78: 809-818, 1996.
 Murphy et al, *Prostate*, 26:164-168, 1995.
 20 Nakamura et al. En: *Handbook of Experimental Immunology*, (4^a Ed.), Weir, E., Herzenberg, L.A., Blackwell. C., Herzenberg, L. (Eds.), Vol. 1., Capítulo 27, Blackwell Scientific Publ., Oxford, 1987.
 Nicolas y Rubinstein, en: *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Rodriguez y Denhardt (Eds.), Butterworth, Stonehah, pp 494-513, 1988.
 Nicolau y Sene, *Biochinu Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.
 25 O'Dowd et al, *J. Urol.* 158:687-698, 1997.
 O'Hare et al., *Proc. Naf'l Acad. Sci. USA*, 78:1527, 1981.
 Oesterling et al, *J. Urol.*, 154:1090-1095, 1995.
 Ohara et al, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 86:5673-5677, 1989.
 Orozco et al, *Urology*, 51:186-195, 1998.
 30 Parker et al, *CA Cancer J. Clin.*, 65:5-27, 1996.
 Partin y Oesterling, *Urology*, 48 (6A):1-3, 1996.
 Partin y Oesterling, *J. Urol.*, 152:1358-1368, 1994.
 Partin y Oesterling (Eds.), *Urology*, 48(6A) Suplemento: 1-87, 1996.
 Paskind et al. *Virology*, 67:242-248, 1975.
 35 *Solicitud PCT N° PCT/US87/00880*
 Pettersson et al, *Clin. Chem.*, 41(10): 1480-1488, 1995.
 Piironen et al, *Clin. Chem.* 42:1034-1041, 1996.
 Potter et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81:7161-7165. 1984.
 40 Racher et al., *Biotechnology Techniques*, 9:169-174, 1995.
 Ragol et al, *Nature*, 361:647-650, 1993.
 Ralph y Veltri, *Advanced Laboratory*, 6:51-56, 1997.
 Ralph et al, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 90(22): 10710-10714, 1993.
 Reinhold-Hurek y Shub, *Nature*. 357:173-176, 1992.
 Renan, *Radiother. Oncol.*, 19:197-218, 1990.
 45 Ribas de Pouplana y Fothergill-Gilmore, *Biochemistry*, 33:7047-7055, 1994.
 Rich et al, *Hum. Gene Ther.*, 4:461-476, 1993.
 Ridgeway, en: *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Rodriguez RL, Denhardt DT (Eds.). Butterworth. Stoneham, pp 467-492, 1988.
 50 Rippe et al, *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695, 1990.
 Rosenfeld et al, *Science*, 252:431-434. 1991.
 Rosenfeld et al, *Cell*, 68:143-155, 1992.
 Roux et al, *Proc. Nat'l Acad Sci. USA*, 86:9079-9083, 1989.
 Sager et al., *FASEB J.*, 7:964-970; 1993.
 Sambrook et al, (ed.), en: *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
 55 Santerre et al. *Gene*, 30: 147-156, 1984.
 Sarver, et al, *Science*, 247:1222-1225, 1990.
 Scanlon et al, *Proc Nat'l Acad Sci USA*, 88:10591-10595, 1991.
 Sidransky et al, *Science*, 252:706-709, 1991.
 Sidransky et al., *Cancer Res.*, 52:2984-2986, 1992.
 60 Silver et al, *Clin. Cancer Res.* ,3:81-85, 1997.
 Slamon et al., *Science*, 224:256-262, 1984.
 Slamon et al, *Science*, 235:177-182, 1987.
 Slamon et al. *Science*, 244:707-712, 1989.
 Smith, *Patente estadounidense N° 4.215.051*.

- Soh et al, J. Urol., 157:2212-2218, 1997.
- Stenman et al, Cancer Res., 51:222-226, 1991.
- Stinchcomb et al, Nature, 282:39, 1979.
- 5 Stratford-Perricaudet y Perricaudet, en: Human Gene Transfer, O. Cohen-Haguenauer et al, (Eds.), John LibbeyEurotext, France, pp 51-61, 1991.
- Stratford-Perricaudet et al. Hum. Gene. Ther., 1:241-256, 1990.
- Sun y Cohen, Gene, 137:127-132, 1993.
- Szoka y Papahadjopoulos. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75: 4194-4198, 1978.
- 10 Szybalska et al, Proc. Nat'l Acad Sci. USA, 48:2026, 1962.
- Takahashi et al, Cancer Res., 54:3574-3579, 1994.
- Taparowsky et al, Nature, 300:762-764, 1982.
- Temin, en: Gene Transfer, Kucherlapati R. (Ed.), Plenum Press, New York, pp 149-188. 1986.
- Tooze, en: Molecular Biology of ADN Tumor Viruses, 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1991.
- 15 Top et al, J. Infect. Dis., 124:155-160, 1971.
- Tschemper et al, Gene, 10:157,1980.
- Tvi-Kaspa et al, Mot. Cell Biol, 6:716-718,1986.
- Patente estadounidense nº 5.882.864
- 20 Patente estadounidense nº 4.196.265
- Patente estadounidense nº 4.215.051
- Patente estadounidense nº 4.683.195
- Patente estadounidense nº 4.683.202
- Patente estadounidense nº 4.800.159
- Patente estadounidense nº 4.883.750
- 25 Patente estadounidense nº 5.354.855
- Patente estadounidense nº 5.359.046
- Varmus et al. Cell, 25:23-36, 1981.
- Veltri et al, J. Cell Biochem.. 19(supl):249-258, 1994
- Veltri et al. Urology, 48: 685-691, 1996.
- 30 Veltri et al, Sem. Urol. Oncol, 16:106-117, 1998.
- Veltri et al, Urology, 53:139-147, 1999.
- Visakorpi et al, Am, J. Pathol, 145:1-7, 1994.
- Wagner et al, Science, 260:1510-1513, 1993.
- Walker et al, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 89:392-396, 1992.
- 35 Watson et al, Cancer Res., 54:4598-4602,1994.
- Welsh et al.Nucl. Acids Res., 20:4965-4970, 1992.
- Wigler et al. Cell, 11:223. 1977.
- Wigler et al, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 77:3567, 1980.
- Wingo et al, CA Cancer J. Clin., 47: 239-242, 1997.
- 40 WO 90/07641, presentada el 21 de diciembre, 1990.
- Wong et al, Int. J. Oncol, 3:13-17, 1993.
- Wu y Wu, J. Biol Chem., 262:4429-4432, 1987.
- Wu y Wu, Biochemistry, 27: 887-892, 1988.
- Wu y Wu, Adv. Drug Delivery Rev., 12: 159-167, 1993.
- 45 Wu et al, Genomics, 4:560, 1989.
- Yang et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:9568-9572, 1990.
- Yokoda et al, Cancer Res. 52, 3402-3408, 1992.
- Zlotta et al, J. Urol., 157:1315-1321, 1997.

LISTADO DE SECUENCIAS

Veltri, Robert <110> An, Gang

<120> Nuevo gen específico de la próstata para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer de próstata

<130> 57618-807067

<140> US 13/157,691

<141> 2011-06-10

<150> US 09/247,188

<151> 1999-02-09

<150> US 09/579,236

<151> 2000-05-24

<150> US 09/962,902

<151> 2001-09-25

<150> US 11/706,417

<151> 2007-02-12

<160> 18

5 <170> FastSEQ para Windos, Versión 4.0

<210> 1

<211> 1934

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10 <220>

<223> uc41 prostático específico, CADN, UC Band #41

<220>

<221> CDS

<222> (1320)...(1697)

15 <223> UC41

<400> 1
 ataaatactc acacttttcaa agtaaacgct cttctttttct atgtgctcca tatcgctttg 60
 ccctcttttat ttgagcaacg taccctgtag tgtgtaaata agagatgaca gctcctataa 120
 tacgtgtggg tgaggaatgg gttcgataaa acagaagcat gcacaattca aatagcaagc 180
 cctgtcccac tcagttttatg cacaataaac ttgcagattc tctgattttc tgccagcaac 240
 tgctctctct tccccctccc actgccttcc agaagtctct cagaatcata tccggcacgg 300
 tgtatagaga taggagtaat agggataaga cttgtttttt ctgaatttta attattgtca 360
 ttttagcattt gctcagtggt ttgtgatgaa aatcgttggg ttttacttat ttttactatg 420
 ggcaaatgga gatgccttta atcataaagg cagccccaac ccaaggtagc cttgcataat 480
 agcgggaagg gtgagattag gagtaagcct ttagagcacc ggtgcaggac tcaggatatg 540
 gatttgtggc ttgttcttat atgccgtatt tgtcttatgg gtaaatgctg tatatcggtt 600
 tgatttttcc tatcgtggaa cacttttcag ttatatgtct ggtggaatca agtggttcat 660
 gttactttta aatgtacata ggtggcctaa ttttttttat ttacaattca gcacttcaga 720
 tgtgaagaga tatggctttt tctttttttt tttttttaca acagaatata acttgcttct 780
 gagccctcat ttctgattgg tgggtgatgga aaccttagct tgcctgttgg aggttaactgt 840
 cacttccaat tcactgcagt cttgtccagg ttaacacaat catgttgggtg taaatagtca 900
 actgattggt taaatagtca caaacttctt atctaagtga ttctcccctc 960
 tcaaggaatt tccccctcct gtctcttttc cagtatgta tctgggttca gagtgggtac 1020
 ttgtataact acacaacaca gaggaagaga gtccagtctt catgcagtca tctggatccc 1080
 tgctggccac ctctgaagta gatgtctata tccactgtgc taagtgggtc tggaaatgga 1140
 tccagttggg cattagtggg gctctagaac ctgctgatga ttcattgggtc ctgccaactt 1200
 cctctctatg cctctctcat tcaaagtga ggtttctttc agcttattgg ccctttggcc 1260
 cattcccatc cttttagtaga acttctgcag accacattca gccactggaa aaccaaata 1320
 tgcttttcca tctctctcct ctccttcacg atgccattct gccatttctg ttttgtggta 1380
 gacaggttgg tccaggcact ctaaggcca ggctggcaca ggttggccca ggcacttcaa 1440

UROC_024 EPD1 – Listado de secuencias actualizado (TXT. TXT)

gcctaagtcc atttacagtt tctattccat ctattcctaa agaaggaggc agagggcagg 1500
 tctcaactcg tgtttcagca ctgctgtttt acacacacac acacaccctc tctccaggca 1560
 tctctaactc aggcagaact tttatttctt cccaatatgg cagaaaccac cttcaatttc 1620
 atatcaggat atttccttct ttattgttta tagtttactt tgcaactgag gtgatctcca 1680
 aagaggctga tagatgagga ctaattgcta actgcactcc cagctgcaac aggcataag 1740
 gaagatatgg gtggtccatc tccatgttca ttacagtgat aggtcagctg tctccaacct 1800
 ttttggcatc agggactagt tttgtggaag acaatttttc catggacatg ggggtggggaa 1860
 ggaaggagat gattttgggt tgaaactgtt ccacttcaga ctcagatcat caggcgtag 1920
 attatcataa ggac 1934

<210> 2

5 <211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223>UC41 prostático específico, UC Band #41

<400> 2
 Met Leu Ser His Leu Ser Pro Leu Leu His Asp Ala Ile Leu Pro Phe
 1 5 10 15
 Leu Phe Cys Gly Arg Gln Val Gly Pro Gly Thr Leu Arg Pro Arg Leu
 20 25 30
 Ala Gln Val Gly Pro Gly Thr Ser Ser Leu Ser Pro Phe Thr Val Ser
 35 40 45
 Ile Pro Ser Ile Pro Lys Glu Gly Gly Arg Gly Gln Val Ser Thr Arg
 50 55 60
 Val Ser Ala Leu Leu Phe Tyr Thr His Thr His Thr Leu Ser Pro Gly
 65 70 75 80
 Ile Ser Asn Ser Gly Arg Thr Phe Ile Ser Ser Gln Tyr Gly Arg Asn
 85 90 95
 His Leu Gln Phe His Ile Arg Ile Phe Pro Ser Leu Leu Phe Ile Val
 100 105 110
 Tyr Phe Ala Thr Glu Val Ile Ser Lys Glu Ala Asp Arg
 115 120 125

<2010> 3

<211> 1322

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Porción sintética de la secuencia uc41 cADN 5' a uc41 EST, uc41 cADN residuos 1-1322

```
<400> 3
ataaatactc acactttcaa agtaaagcgt cttcttttct atgtgctcca tatcgctttg 60
ccctctttat ttgagcaacg taccctgtag tgtgtaaata agagatgaca gctcctataa 120
tacgtgtggg tgaggaatgg gttcgataaa acagaagcat gcacaattca aatagcaagc 180
cctgtcccac tcagtttatg cacaataaac ttgcagattc tctgattttc tgccagcaac 240
tgcctcctct tccccctccc actgccttcc agaagtctct cagaatcata tccggcacgg 300
tgtatagaga taggagtaat agggataaga cttgtttttt ctgaatttta attattgtca 360
tttagcattt gctcagtgtt ttgtgatgaa aatcgttggg ttttacttat ttttactatg 420
ggcaaatgga gatgccttta atcataaagg cagccccaac ccaagggtacc cttgcataat 480
agcgggaagg gtgagattag gagtaagcct ttagagcacc ggtgcaggac tcaggatatg 540
gatttgtggc ttgttcttat atgccgtatt tgtcttatgg gtaaagtctg tataatcgttt 600
tgatttttcc tatcgtggaa cacttttcag ttatatgtct ggtggaatca agtggttcat 660
gttactttta aatgtacata ggtggcttaa ttttttttat ttacaattca gcacttcaga 720
tgtgaagaga tatggctttt tctttttttt tttttttaca acagaatata acttgcttct 780
gagccctcat ttctgattgg tgggtgatgga aaccttagct tgcctggtgg aggttaactgt 840
cacttccaat tcactgcagt cttgtccagg ttaacacaat catgttgggtg taaatagtca 900
actgaggatt taaatagtca attcaaaatg caaacttctt atctaagtga ttctcccctc 960
tcaaggaatt tcccccttct gtcctctttc cagtatgtta tctgggttca gagtgggtac 1020
ttgttaact acacaacaca gaggaagaga gtccagtctt catgcagtca tctggatccc 1080
tgctggccac ctctgaagta gatgtctata tccactgtgc taagtgggtc tggaaatgga 1140
tccagttggg cattagtggg gctctagaac ctgctgatga ttcattgggtc ctgccaactt 1200
cctctctatg cctcctcat tcaaagtga ggtttctttc agcttattgg ccttttggcc 1260
```

UROC_024EPD1 – Listado de secuencias actualizado (TXT). TXT

```
cattcccatt cttttagtaa acttctgcag accacattca gccactggaa aaccaaata 1320
tg 1322
```

10

<211> 434

<212>ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Porción sintética de la secuencia UC41 cADN 3' a uc41 EST, UC41 cADN residuos 1501-1934

```
<400> 4
tctcaactcg tgtttcagca ctgctgtttt acacacacac acacaccctc tctccaggca 60
tctctaactc aggcagaact tttatttcct cccaatatgg cagaaaccac cttcaatttc 120
atatcaggat atttcttctt ttattgttta tagtttactt tgcaactgag gtgatctcca 180
aagaggctga tagatgagga ctaattgcta actgcactcc cagctgcaac aggcattgaag 240
gaagatatgg gtggtccatc tccatgttca ttacagtgat aggtcagctg tctccaacct 300
ttttggcatc agggactagt tttgtggaag acaatttttc catggacatg ggggtggggaa 360
ggaaggagat gattttgggt tgaaactgtt ccacttcaga ctcagatcat caggcgtag 420
attatcataa ggac 434
```

<210> 4

<211> 65

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Posiciones sintéticas 61-125 de UC41, péptido de unión a anticuerpo

	<400> 5 Val Ser Thr Arg Val Ser Ala Leu Leu Phe Tyr Thr His Thr His Thr 1 5 10 15 Leu Ser Pro Gly Ile Ser Asn Ser Gly Arg Thr Phe Ile Ser Ser Gln 20 25 30 Tyr Gly Arg Asn His Leu Gln Phe His Ile Arg Ile Phe Pro Ser Leu 35 40 45 Leu Phe Ile Val Tyr Phe Ala Thr Glu Val Ile Ser Lys Glu Ala Asp 50 55 60 Arg 65 <210> 6 <211>10 <212>ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador de PCR 10-mer arbitrario sintético para identificar UC41	
5		
	<400> 6 ctagtgatta <210> 7 <211> 10 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador de PCR 10-mer arbitrario sintético para identificar UC41	10
10		
	<400> 7 gtccttatga <210> 8 <211> 29 <212>ADN <213>Secuencia artificial <220> <223> Cebador directo de PCR de amplificación sintética para generar la sonda de UC41 para la hibridación <i>in situ</i>	10
15		
	UROX_024EPD1 – Listado de secuencias actualizado (TXT). TXT <210> 8 <211> 29 <212>ADN <213>Secuencia artificial <220> <223> Cebador directo de PCR de amplificación sintética para generar la sonda de UC41 para la hibridación <i>in situ</i>	
20		
	<400> 8 aaaacgatat catgctttct catctctcc --- <210> 9 <211> 32 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador inverso de PCR de amplificación sintética para generar la sonda de UC41 para la hibridación <i>in situ</i>	29
25		
30		

	<400> 9 caattgcggc cgctctatca gcctctttgg ag	32
	<210> 10	
	<211>24	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo de amplificación de RT-PCR semicuantitativa específica para UC41 sintético	
	<400> 10 caaataagcaa gccctgcccc ctca	24
10	<210> 11	
	<211> 25	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de amplificación de RT-PCR semicuantitativa específica para UC41 sintético	
20	<400> 11 ctcctaattct caccctttcc gctat	25
	<210> 12	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Cebador directo de amplificación de PCR específica para β -2-microglobulina sintética	
	<400> 12 cacgtcatcc agcagagaat ggaaagtc	28
	<210> 13	
30	<211> 28	
	<212>ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de amplificación de PCR específica para β -2-microglobulina sintética	
35	UROC_024EPD1 – Listado de secuencias actualizado (TXT).TXT	
	<400> 13 gagaataggt tgtagttgta gaaccagt	28
	<210>14	
	<211>21	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador directo de PCR específico para UC41 sintético	

	<400> 14 ctgccaactt cctctctatg c	21
	<210> 15	
	<211> 23	
	<212>ADN	
5	<213>Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador inverso de PCR específico para UC41 sintético	
	<400> 15 gtcctcatct atcagcctct ttg	23
10	<210>16	
	<211>6	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Aminoácidos adicionales 6XHis sintéticos	
	<400> 16 His His His His His His 1 5	
	<210>17	
	<211>6	
	<212> PRT	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Potencial sitio de miristoilación de UC41 sintético, residuos 59-64	
	<400> 17 Gly Gln Val Ser Thr Arg 1 5	
25	<210>18	
	<211>6	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Potencial sitio de miristoilación de UC41 sintético, residuos 80-85	
	<400> 18 Gly Ile Ser Asn Ser Gly 1 5	

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la capacidad de una sustancia candidata para inhibir la expresión de un gen UC41 correspondiente a una secuencia de cADN que comprende la secuencia de polinucleótidos expuesta en cualquiera de las SEQ. ID. Nº 1, 3 o 4. El método se compone de los pasos de:
- 5 (a) proporcionar al menos una célula prostática de expresión de UC41;
- (b) poner en contacto dicha célula prostática con la sustancia candidata;
- (c) medir el nivel de expresión de UC41 en la mencionada célula prostática; y
- (d) comparar el nivel de expresión de UC41 de la célula prostática medido en el paso (c) con el nivel de expresión de UC41 medido en una célula prostática en ausencia de la sustancia candidata.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en donde la expresión de UC41 se mide mediante la detección de la expresión de un polinucleótido que se hibrida con la secuencia de polinucleótidos expuesta en las SEQ. ID. Nº 1,3 o 4.
3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 en donde se proporciona al menos una célula prostática que expresa UC41 como célula adherente en una placa de cultivo, como parte de una biomatriz de alginato, o en un cultivo en suspensión.
- 15 4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, en donde el nivel de expresión de UC41 se mide mediante análisis Northern blot o spot blot de los productos de RNA del gen UC41.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3, en las que el nivel de expresión de UC41 se mide mediante análisis Western blot de los productos proteicos del gen UC41.
- 20 6. El uso de una célula prostática que expresa un gen UC41 correspondiente a una secuencia de cADN que comprende la secuencia de polinucleótidos expuesta en cualquiera de las SEQ. ID. Nº 1, 3 o 4 para detectar la presencia de moduladores de la expresión de UC41.
7. El uso de la reivindicación 7, en donde la célula prostática que expresa UC41 se proporciona como una célula adherente en una placa de cultivo, como parte de una biomatriz de alginato, o en un cultivo en suspensión.

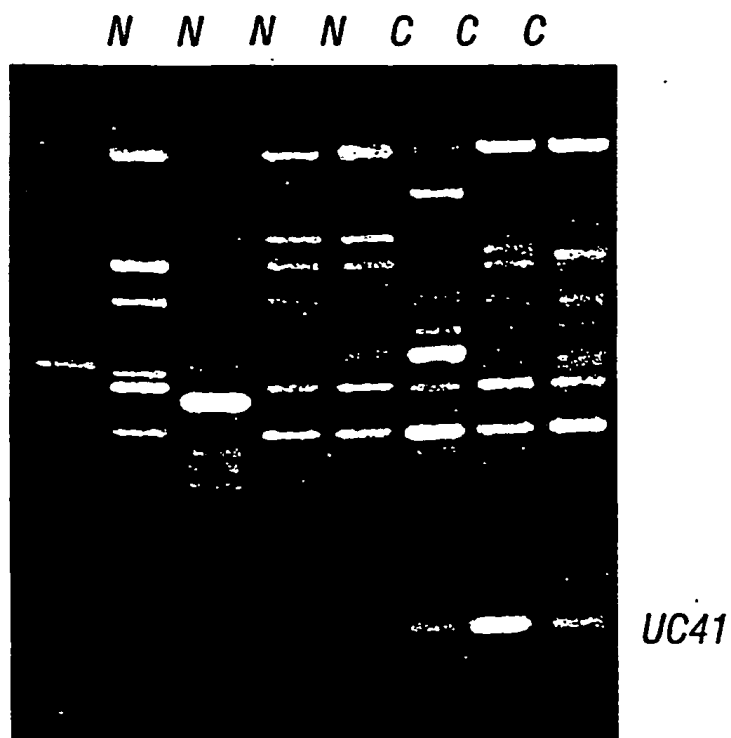


FIG. 1A

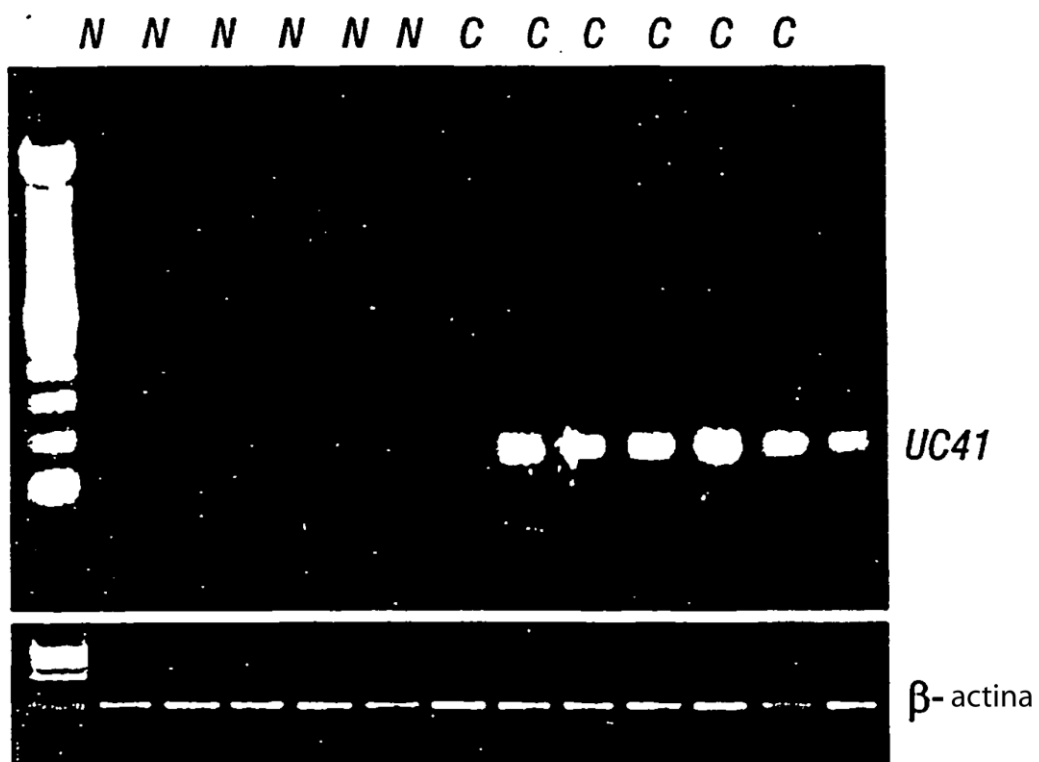


FIG. 1B

FIG. 2

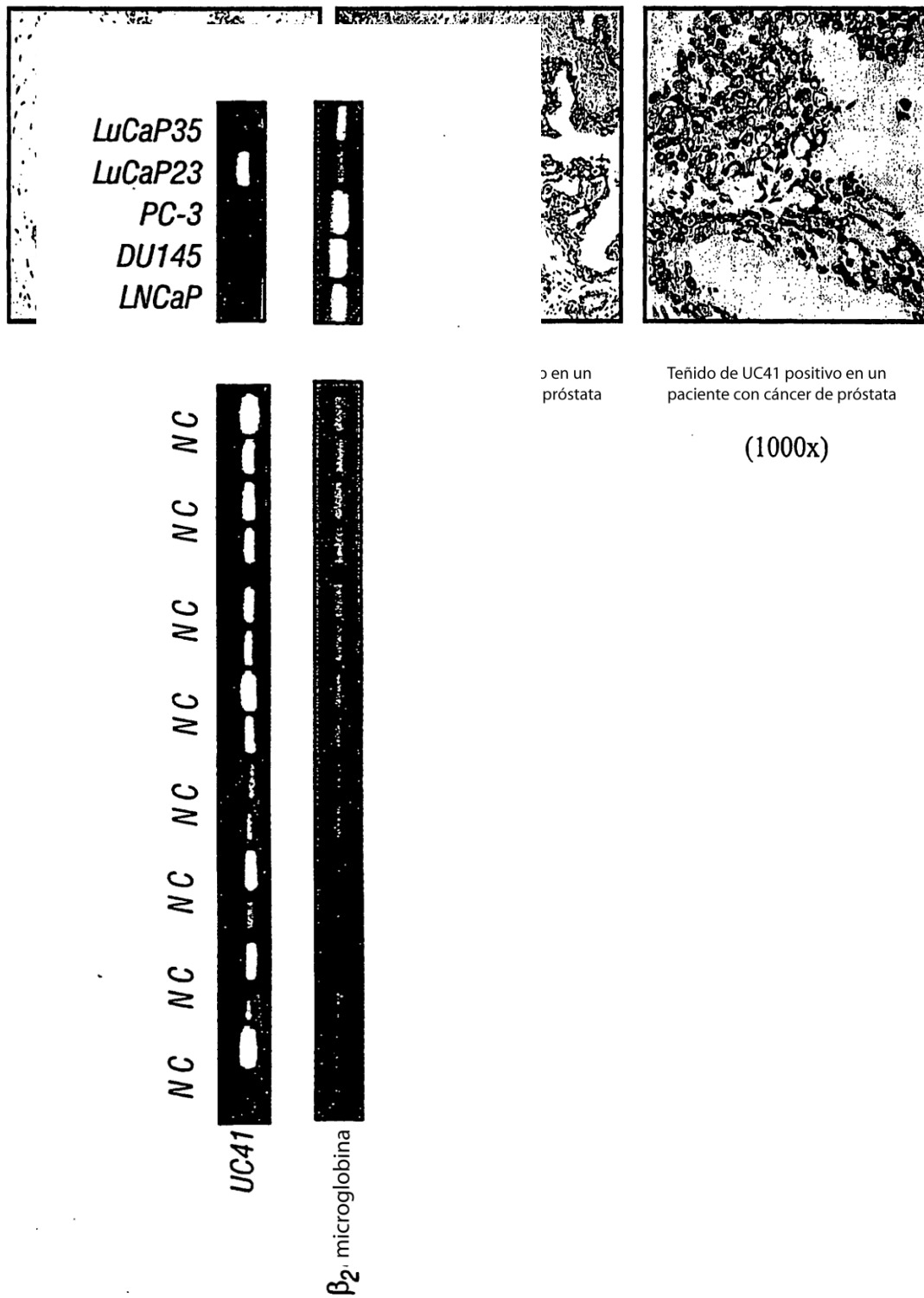


FIG. 3



Control negativo (250X)



Teñido de UC41 positivo en un
paciente con cáncer de próstata

(250x)



Teñido de UC41 positivo en un
paciente con cáncer de próstata

(1000x)

FIG 4



Control negativo
(1000x)



Teñido de UC41 positivo en un
paciente con cáncer de
próstata con nódulos
linfáticos positivos

(500x)



Teñido de UC41 positivo en un
paciente con cáncer de
próstata con nódulos
linfáticos positivos

(1000x)

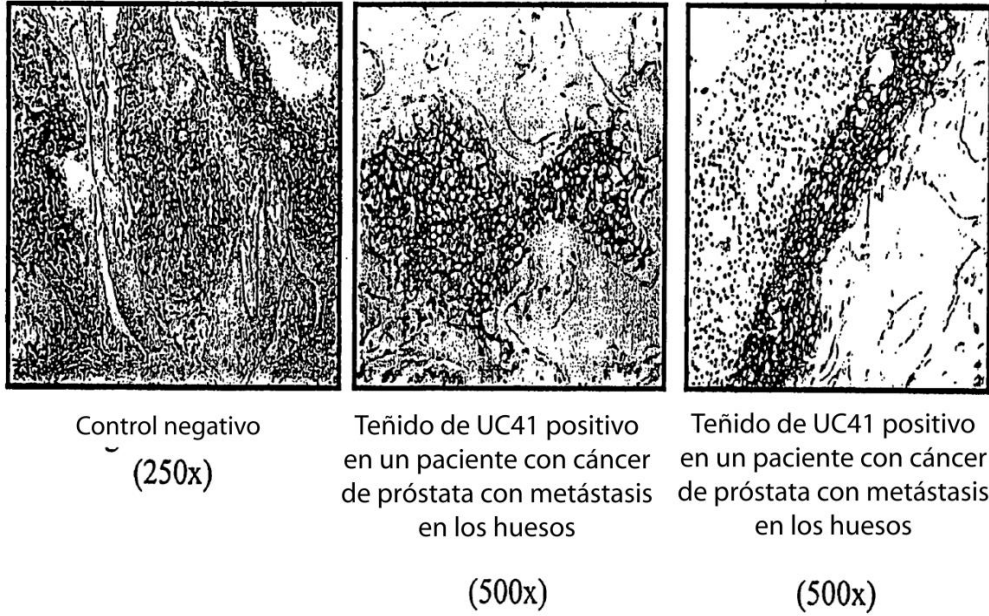


FIG. 5

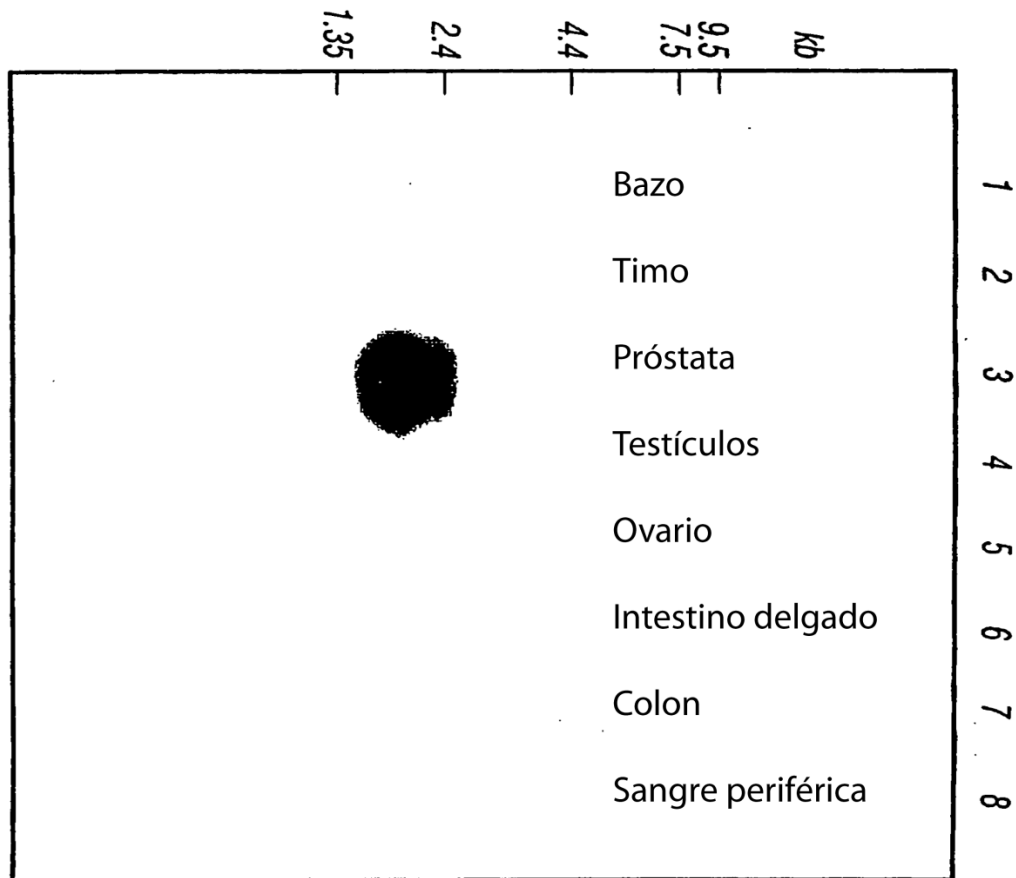


FIG. 6

A1 Cerebro completo	A2 Amígdala	A3 Núcleo caudado	A4 Cerebelo	A5 Corteza cerebral	A6 Lóbulo frontal	A7 Hipocampo	A8 Bulbo raquídeo
B1 Lóbulo occipital	B2 Putamen	B3 Sustancia negra	B4 Lóbulo temporal	B5 Tálamo	B6 Núcleo accumbens	B7 Médula espinal	B8
C1 Corazón	C2 Aorta	C3 Músculo esquelético	C4 Colon	C5 Vejiga	C6 Útero	C7 Próstata	C8 Estómago
D1 Testículos	D2 Ovario	D3 Páncreas	D4 Glándula pituitaria	D5 Glándula adrenal	D6 Glándula tiroides	D7 Glándula salival	D8 Glándula mamaria
E1 Riñón	E2 Hígado	E3 Intestino delgado	E4 Bazo	E5 Timo	E6 Leucocito periférico	E7 Nódulo linfático	E8 Médula ósea
F1 Apéndice	F2 Pulmón	F3 Tráquea	F4 Placenta	F5	F6	F7	F8
G1 Cerebro fetal	G2 Corazón fetal	G3 Riñón fetal	G4 Hígado fetal	G5 Bazo fetal	G6 Timo fetal	G7 Pulmón fetal	G8
H1 RNA total de levadura	H2 tRNA de levadura	H3 rRNA de E. coli	H4 DNA de E. coli	H5 Poli r(A)	H6 DNA humano C ₀ t1	H7 DNA humano	H8 DNA humano

FIG. 7

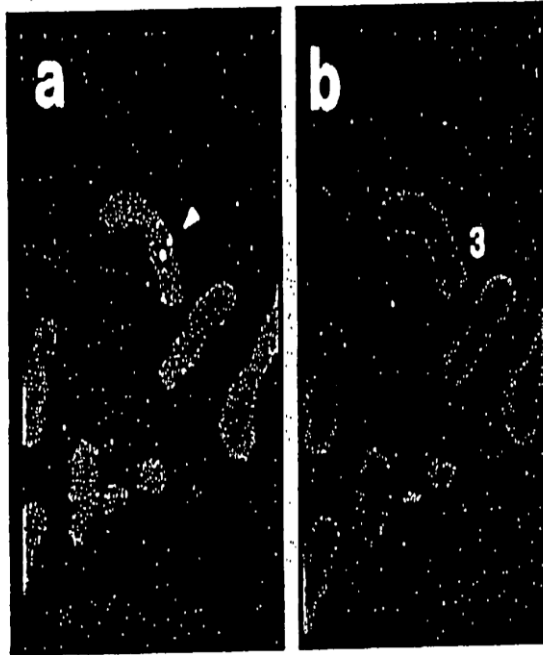


FIG. 8A

FIG. 8B

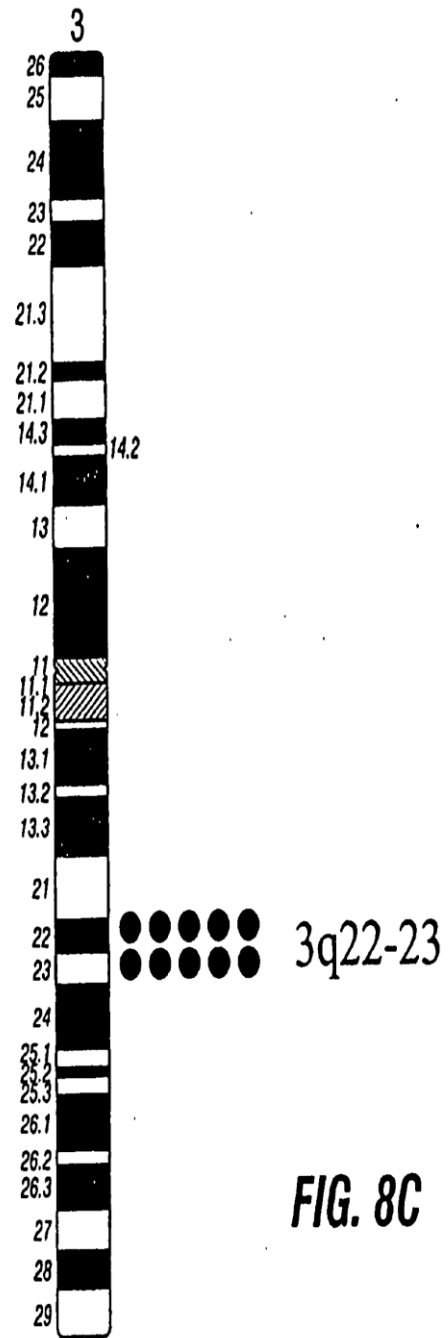


FIG. 8C

1 ATAAATACTCACACTTTCAAAGTAAACGCTCTTCTTTTCTATGTGCTCCA
 51 TATCGCTTTGCCCTCTTTATTTGAGCAACGTACCCTGTAGTGTGTAAATA
 101 AGAGATGACAGCTCCTATAATACGTGTGGGTGAGGAATGGGTTTCGATAAA
 151 ACAGAAGCATGCACAATTCAAATAGCAAGCCCTGTCCCACTCAGTTTATG
 201 CACAAATAACTTGCAGATTCTCTGATTTTCTGCCAGCAACTGCCTCCTCT
 251 TCCCCTCCCCACTGCCTTCCAGAAGTCTCTCAGAATCATATCCGGGCACGG
 301 TGTATAGAGATAGGAGTAATAGGGATAAGACTTGTTTTTCTGAATTTTA
 351 ATTATTGTCATTTAGCATTGCTCAGTGTTTTGTGATGAAAATCGTTGGG
 401 TTTTACTTATTTTACTATGGGCAAATTGAGATGCCTTTAATCATAAAGG
 451 CAGCCCCAACCCAAGGTACCCTTGCATAATAGCGGAAGGGGTGAGATTAG
 501 GAGTAAGCCTTTAGAGCACCGGTGCAGGACTCAGGATATGGATTGTGGC
 551 TTGTTCTTATATGCCGTATTTGTCTTATGGGTAAATGCTGTATATCGTT
 601 TGATTTTCTTATCGTGGAACACTTTTCAGTTATATGTCTGGTGGAATCA
 651 AGTGTTTCATGTTACTTTTAAATGTACATAGGTGGCTTAATTTTTTTAT
 701 TTACAATTCAGCACTTCAGATGTGAAGAGATATGGCTTTTTCTTTTTTT
 751 TTTTTTACAACAGAATATAACTTGCTTCTGAGCCCTCATTTCTGATTGG
 801 TGGTGATGGAAACCTTAGCTTGCCTGTTGGAGGTAACGTCACTTCCAAT
 851 TCACTGCAGTCTTGTCCAGGTAAACACAATCATGTTGGTGTAATAGTCA
 901 ACTGAGGATTTAAATAGTCAATTCAAAATGCAAACCTTCTTATCTAAGTGA
 951 TTCTCCCCTCTCAAGGAATTTCCCCTTCCTGTCCTCTTCCAGTATGTTA
 1001 TCTGGGTTTCAGAGTGGGTACTTGTATAACTACACAACACAGAGGAAGAGA
 1051 GTCCAGTTCTCATGCAGTCATCTGGATCCCTGCTGGCCACCTCTGAAGTA
 1101 GATGTCTATATCCACTGTGCTAAGTGGTCTTCCAATGGATCCAGTTGGT
 1151 CATTAGTGGAGCTCTAGAACCTGCTGATGATTCATGGTCCCTGCCAACTT
 1201 CCTCTCTATGCCCTCCTCATTCAAAGTGAAGGTTTCTTTCAGCTTATTGG
 1251 CCCTTTGGCCCATTCCTTCTTTGTAGAACTTCTGCAGACCACATTCA

FIG. 9A

1301 GCCACTGGAAAACCAAAATATGCTTTCTCATCTCTCTCCTCTCCTTCACG
 1351 ATGCCATTCTGCCATTTCTGTTTTGTGGTAGACAGGTTGGCCCAGGCACT
 1401 CTAAGGCCAGGCTGGCACAGGTTGGCCCAGGCACTTCAAGCCTAAGTCC
 1451 ATTTACAGTTTCTATTCCATCTATTCCTAAAGAAGGAGGCAGAGGGCAGG
 1501 TCTCAACTCGTGTTTCAGCACTGCTGTTTTACACACACACACACCCTC
 1551 TCTCCAGGCATCTCTAACTCAGGCAGAACTTTTATTTCTCCCAATATGG
 1601 CAGAAACCACCTTCAATTTTCATATCAGGATATTTCTTCTTTATTGTTA
 1651 TAGTTTACTTTGCAACTGAGGTGATCTCCAAAGAGGCTGATAGATGAGGA
 1701 CTAATTGCTAACTGCACTCCCAGCTGCAACAGGCATGAAGGAAGATATGG
 1751 GTGGTCCATCTCCATGTTTATTACAGTGATAGGTCAGCTGTCTCCAACCT
 1801 TTTTGGCATCAGGGACTAGTTTTGTGGAAGACAATTTTCCATGGACATG
 1851 GGGTGGGGAAGGAAGGAGATGATTTTGGGTTGAACTGTTCCACTTCAGA
 1901 CTCAGATCATCAGGCGTTAGATTATCATAAGGAC (SEQ ID NO:1)



FIG. 9B