

(11) Número de Publicação: **PT 1220913 E**

(51) Classificação Internacional:

C12N 15/12 (2006.01) **A01K 67/027** (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) **A61K 31/713**
(2006.01)
A61K 35/66 (2006.01) **A61K 35/76** (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) **A61K 38/17** (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) **A61P 13/00** (2006.01)
A61P 13/08 (2006.01) **C07K 14/435** (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01) **C07K 14/705** (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01) **C07K 16/28** (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) **C12N 1/19** (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) **C12N 5/10** (2006.01)
C12N 5/12 (2006.01) **C12N 15/09** (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01) **C12P 21/08** (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01) **C12Q 1/68** (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01) **G01N 33/53** (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01) **G01N 33/577** (2006.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2000.10.05**

(30) Prioridade(s): **1999.10.05 US 157902 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2002.07.10**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.12.10**
032/2009

(73) Titular(es):

AGENSYS, INC.
1545 17TH STREET SANTA MONICA, CA 90404
US

(72) Inventor(es):

ARTHUR B. RAITANO **US**
MARY FARIS **US**
RENE S. HUBERT **US**
DANIEL E. H. AFAR **US**
AYA JAKOBOVITS **US**

(74) Mandatário:

ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS
RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **RECEPTOR ACOPLADO A PROTEÍNA G REGULADO POSITIVAMENTE EM**
CANCRO DA PRÓSTATA E SUAS UTILIZAÇÕES

(57) Resumo:

RESUMO**"RECEPTOR ACOPLADO A PROTEÍNA G REGULADO POSITIVAMENTE EM
CANCRO DA PRÓSTATA E SUAS UTILIZAÇÕES"**

São descritos um novo gene (denominado PHOR-1), que é altamente sobre-expressado em cancro da próstata e outros e a sua proteína codificada. PHOR-1 é um receptor acoplado a proteína G com homologia com receptores envolvidos no olfacto. PHOR-1 em tecidos humanos normais está restrito à próstata e este gene é altamente sobre-expressado em cancro da próstata, assim como em câncros do rim, útero, cervical, estômago e recto. Consequentemente, PHOR-1 proporciona um alvo de diagnóstico e/ou tratamento para cancro da próstata.

DESCRIÇÃO

"RECEPTOR ACOPLADO A PROTEÍNA G REGULADO POSITIVAMENTE EM CANCRO DA PRÓSTATA E SUAS UTILIZAÇÕES"

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção aqui descrita refere-se à utilização de um polipéptido derivado de PHOR-1 como um marcador para vários cancros que expressam PHOR-1, particularmente cancros da próstata.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO.

O cancro é a segunda causa principal de morte em humanos a seguir às doenças das coronárias. Em todo o mundo, milhões de pessoas morem de cancro todos os anos. Apenas nos Estados Unidos da América, o cancro provoca a morte de bem mais de meio milhão de pessoas anualmente, com alguns 1,4 milhões de novos casos diagnosticados por ano. Embora as mortes por doença cardíaca tenham diminuído significativamente, aquelas que resultam de cancro, de um modo geral estão a subir. No início deste novo século, prevê-se que o cancro se torne a principal causa de morte.

Em todo o mundo, vários cancros sobressaem como líderes na causa de morte. Em particular, carcinomas do

pulmão, próstata, mama, cólon, pâncreas, e ovário representam as principais causas de morte por cancro. Estes, e virtualmente todos os outros carcinomas, partilham uma característica letal comum. Com muito poucas excepções, a doença metastática de um carcinoma é fatal. Para além disso, mesmo para aqueles doentes de cancro que inicialmente sobrevivem aos seus cancros primários, a experiência comum demonstrou que as suas vidas são dramaticamente alteradas. Muitos doentes de cancro sofrem fortes ansiedades provocadas pela tomada de consciência do potencial para recorrência ou falha do tratamento. Muitos doentes de cancro sofrem debilitações físicas após o tratamento. Muitos doentes de cancro sofrem uma recorrência.

Em todo o mundo, o cancro da próstata é a quarto cancro mais prevalente nos homens. Na América do Norte e no Norte da Europa, é de longe o cancro masculino mais comum e é a segunda causa principal de morte por cancro nos homens. Apenas nos Estados Unidos da América, bem mais de 40 000 homens morrem anualmente destas doença - logo a seguir ao cancro do pulmão. Apesar da magnitude destes números, ainda não existe tratamento eficaz para o cancro da próstata metastático. A prostatectomia cirúrgica, terapia por radiação, terapia por sequestro hormonal, e quimioterapia continuam a ser as principais modalidades de tratamento. Infelizmente, estes tratamentos são ineficazes para muitos e estão frequentemente associados a consequências indesejáveis.

Na frente de diagnóstico, a falta de um marcador de tumor da próstata que possa detectar com precisão tumores localizados, em estado precoce, permanece uma limitação significativa na gestão desta doença. Embora o ensaio de PSA no soro tenha sido uma ferramenta útil, a sua especificidade e utilidade geral é grandemente encarada como estando em falta em relação a vários aspectos importantes.

O progresso em identificar marcadores específicos adicionais para o cancro da próstata melhorou através da criação de xenoenxertos do cancro da próstata que podem recapitular estádios diferentes da doença em ratinhos. Os xenoenxertos do LAPC (Los Angeles Prostate Cancer) são xenoenxertos de cancro da próstata que sobreviveram a passagem em vários ratinhos com deficiência imunitária combinada severa (SCID) e apresentaram a capacidade para mimetizar a progressão da doença, incluindo a transição da dependência de androgénio para independência de androgénio e o desenvolvimento de lesões metastáticas (Klein *et al.*, 1997, *Nat. Med.* 3:402). Marcadores de cancro da próstata identificados mais recentemente incluem PCTA-1 (Su *et al.*, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7252), antígeno para células estaminais da próstata (PSCA) (Reiter *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1735), e STEAP (Hubert *et al.*, 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 14523).

Embora marcadores previamente identificados, tais como PSA, PSM, PCTA e PSCA tenham facilitado os esforços

para diagnosticar e tratar o cancro da próstata, existe uma necessidade para a identificação de marcadores adicionais e alvos terapêuticos para cancro da próstata e cancros relacionados, de modo a melhorar ainda mais o diagnóstico e a terapia.

WO 9906550 revela 5-ESTs derivados de mRNAs que codificam para proteínas secretadas. Bepler *et al.*, em *Genomics* 55, Jan. 1999, P164-175 revela as sequências do segmento cromossómico 11p 15,5 e dos genes na região supressora de metástase LOH11A.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um novo receptor acoplado a proteína G específico para a próstata regulado positivamente no cancro da próstata, denominado PHOR-1. A expressão de PHOR-1 é grandemente restringida à próstata, e é marcadamente regulada positivamente em tumores da próstata. A expressão de PHOR-1 em próstata normal/amostras tumorais compatíveis de doentes com cancro da próstata avançado, utilizando tanto métodos de detecção de mRNA como de proteína, apresenta um grau elevado de expressão regulada positivamente no tecido tumoral, sugerindo que PHOR-1 é um marcador útil para a detecção de cancro da próstata. A análise de amostras normais/tumorais de outros doentes de cancro humanos demonstra regulação positiva de expressão de PHOR-1 igualmente em cancro do rim, uterino, cervical, do estômago e rectal. Adicionalmente, a expressão

de PHOR-1 induz o crescimento de colónias e modula a fosforilação de cAMP e da tirosina de modos indicadores de um papel funcional na tumorigénese e transformação, proporcionando um alvo estratégico para a terapia do cancro.

A estrutura de PHOR- inclui sete domínios putativos de transmembrana que se estendem pela sequência de 317 aminoácidos da proteína. PHOR-1 é expressado na superfície da célula, com o terminal N exposto na parte de fora da membrana celular.

A proteína PHOR-1 é homóloga a uma grande família de receptores olfactivos que são expressados no epitélio olfactivo e nos neurónios. PHOR-1 apresenta actividade funcional consistente com outros receptores acoplados à proteína G, sugerindo que PHOR-1 desempenha um papel crítico na regulação da função celular, proliferação, e transformação.

São aqui descritas várias abordagens potenciais para o tratamento de cancro da próstata e de outros cancros que expressam PHOR-1. A orientação da superfície celular e a natureza deste receptor acoplado à proteína G apresenta várias abordagens terapêuticas utilizando moléculas que têm como alvo PHOR-1 e a sua função, bem como moléculas que têm como alvo outras proteínas, factores e ligandos que actuam através do receptor PHOR-1. Estas abordagens terapêuticas incluem terapia de anticorpo com anticorpos anti-PHOR-1, terapias de molécula pequena, e terapias de vacina. Adicionalmente, dada a sua expressão regulada positivamente

em cancro da próstata, PHOR-1 é útil como um marcador de diagnóstico, identificador do estágio e/ou prognóstico para cancro da próstata e, de um modo semelhante, pode ser um marcador para outros cancros que expressam este receptor.

A invenção é como definida na reivindicação 1. A especificação descreve os genes PHOR-1, mRNAs, e/ou sequências codificantes, preferencialmente na forma isolada, incluindo polinucleótidos codificando Proteínas PHOR-1 e fragmentos destas, DNA, RNA, híbrido DNA/RNA, e moléculas relacionadas, polinucleótidos ou oligonucleótidos complementares aos genes PHOR-1 ou sequências de mRNA ou partes desta, e polinucleótidos ou oligonucleótidos que hibridam com os genes PHOR-1, mRNAs, ou com polinucleótidos codificando PHOR-1. São também descritos meios para isolar cDNAs e os genes codificando PHOR-1. São também descritas moléculas de DNA recombinante contendo polinucleótidos de PHOR-1, células transformadas ou transduzidas com essas moléculas, e estão também descritos sistemas de vector e hospedeiro para a expressão de produtos do gene PHOR-1.

A invenção descreveu ainda proteínas PHOR-1 e fragmentos polipeptídicos destas, assim como anticorpos que se ligam às proteínas PHOR-1 e fragmentos polipeptídicos destes. Os anticorpos da invenção incluem anticorpos policlonais e monoclonais, anticorpos de murino e de outros mamíferos, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados e totalmente humanos, anticorpos marcados com um marcador detectável, e anticorpos conjugados com radionuclídeos, toxinas ou outras composições terapêuticas.

A invenção descreve ainda métodos para detectar a presença de polinucleótidos e proteínas PHOR-1 em várias amostras biológicas, assim como métodos para identificar células que expressam uma PHOR-1. A invenção descreve ainda várias composições terapêuticas e estratégias, incluindo particularmente, terapia de anticorpo, vacina e de pequena molécula, para tratar cancros da próstata, rim, cervical, útero, recto e estômago.

A invenção descreve adicionalmente um método de identificação de uma molécula que modula uma actividade biológica de PHOR-1. O método compreende colocar em contacto uma molécula com uma célula que expressa PHOR-1, ensaiar a actividade biológica de PHOR-1 na presença e ausência da molécula, e determinar se a actividade biológica de PHOR-1 é alterada pela presença da molécula. Uma alteração na actividade biológica de PHOR-1 é indicadora de uma molécula que modula a actividade biológica de PHOR-1. Preferencialmente, a actividade biológica de PHOR-1 ensaiada no método compreende fosforilação da tirosina, acumulação de cAMP citossólico, ou estimulação do crescimento de colónia.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

FIG. 1A-1D. Sequências de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) e de aminoácidos deduzida (SEQ ID NO: 2) de cDNA de PHOR-1 humano (clone GTH10). A metionina putativa de

início é apresentada a negrito. A sequência exibe duas metioninas adjacentes no início, com a sequência circundando a segunda metionina (ATG ATG G) apresentando uma sequência Kozak. Os sete domínios de transmembrana putativos estão em caixas.

FIG. 2. Alinhamento da sequência de aminoácidos de PHOR-1 humano com HPRAJ70 (SEQ ID NO: 4) e RA1c (SEQ ID NO: 3) utilizando o programa ClustalW 1.7 (BCM Search Launcher). Os domínios de transmembrana putativos estão indicados a negrito ou estão em caixas. O domínio em caixas foi identificado por homologia com HPRAJ70 e RA1c. Os domínios a negrito foram identificados utilizando a ferramenta da web SOSUI em http://www.tuat.ac.jp/~mitaku/adv_sosui/submit.html.

FIG. 3. Sequência de nucleótidos (SEQ ID NO: 5) do fragmento derivado de SSH correspondente ao gene PHOR-1.

FIG. 4. Representação esquemática da topologia grossa da proteína de transmembrana PHOR-1.

FIG. 5A. Análise de expressão por RT-PCR semi-quantitativo apresentando expressão humana de PHOR-1 restringida à próstata e a xenoinxertos de cancro da próstata. São apresentados: cérebro (pista 1), próstata normal (pista 2), LAPC-4 AD (pista 3), LAPC-4 AD 3 dias após castração (pista 4), LAPC-4 AD 14 dias

após castração (pista 5), LAPC-4 AI (pista 6), células HeLa (pista 7) e cntrolo negativo (pista 8).

FIG. 5B. Análise de expressão semi-quantitativa por RT-PCR apresentando expressão de PHOR-1 humana restringida à próstata. São apresentados: cólon (pista 1), ovário (pista 2), leucócitos (pista 3), próstata normal (pista 4), intestino delgado (pista 5), baço (pista 6), testículos (pista 7) e timo (pista 8).

FIGS. 6A-6C apresenta os resultados de análise por transferência de northern da expressão de PHOR-1, demonstrando a expressão restringida a próstata normal e xenoenxertos de cancro da próstata.

FIG. 6A. Análise por transferência de Northern de PHOR-1 em coração (pista 1), cérebro (pista 2), placenta (pista 3), pulmão (pista 4), fígado (pista 5), músculo-esquelético (pista 6), rim (pista 7), e pâncreas (pista 8).

FIG. 6B. Análise de transferência de Northern de PHOR-1 no baço (pista 1), timo (pista 2), próstata normal (pista 3), testículos (pista 4), ovário (pista 5), intestino delgado (pista 6), cólon (pista 7), e leucócitos (pista 8).

FIG. 6C. Análise por transferência de Northern de PHOR-1 em próstata normal (pista 1), LAPC-4 AD (pista

2), LAPC-4 AI (pista 3), LAPC-9 AD (pista 4), e LAPC-9 AI (pista 5).

FIG. 7. Uma análise de expressão de PHOR-1 por transferência por gota de mRNA em 76 amostras diferentes de tecidos humanos apresentando expressão exclusiva para a próstata. Posições representam os seguintes tecidos: A1 cérebro total; A2 cerebelo, esquerdo; A3 substância nigra; A4 coração; A5 esófago; A6 cólon, transverso; A7 rim; A8 pulmão; A9 fígado; A10 HL60, leucemia; A11 cérebro fetal; B1 córtex cerebral; B2 cerebelo, direito; B3 *nucleus accumbens*; B4 aorta; B5 estômago; B6 cólon, descendente; B7 músculo-esquelético; B8 placenta; B9 pâncreas; B10 HeLa, S3; B11 coração fetal; C1 lóbulo frontal; C2 *corpus callosum*; C3 tálamo; C4 átrio, esquerdo; C5 duodeno; C6 recto; C7 baço; C8 bexiga; C9 glândula adrenal; C10 K562, leucemia; C11 rim fetal; D1 lóbulo parietal; D2 amígdala; D3 glândula pituitária; D4 átrio, direito; D5 jejuno; D6 --; D7 timo; D8 útero; D9 glândula tireóide; D10 MOLT-4, leucemia; D11 fígado fetal; E1 lóbulo occipital; E2 *nucleus caudatus*; E3 espinal-medula; E4 ventrículo, esquerdo; E5 íleo; E6 --; E7 leucócitos; E8 próstata; E9 glândula salivar; E10 RAJI, linfoma; E11 baço fetal; F1 lóbulo temporal; F2 hipocampo; F3 --; F4 ventrículo, direito; F5 íleo-cecal; F6 --; F7 nódulo linfático; F8 testículo; F9 glândula mamária; F10 DAUDI, linfoma; F11 timo fetal; G1 gyrus paracentral; G2 medula

oblongata; G3 --; G4 septo interventricular; G5 apêndice; G6 --; G7 medula óssea; G8 ovário; G9 --; G10 SW480, cancro do cólon; G11 pulmão fetal; H1 ossos; H2 putâmen; H3 --; H4 ápice do coração; H5 cólon, ascendente; H6 --; H7 traqueia; H8 --; H9 --; H10 A549, cancro do pulmão; H11 --.

FIG. 8A. Análise de expressão de PHOR-1 por transferência de Northern em xenoenxertos de cancro da próstata humanos, apresentando nível elevado de sobre-expressão de PHOR-1 em tumores da próstata. Próstata normal (pista 1); LAPC-4 AD (pista 2); LAPC-4 AI (pista 3); LAPC-9 AD (pista 4); LAPC-9 AI (pista 5).

FIG. 8B. Análise de expressão de PHOR-1 por transferência de Northern em amostras de biopsia de doente humano, apresentando nível elevado de sobre-expressão de PHOR-1 em tumores da próstata. Próstata normal (pista 6); doente 1, tecido adjacente normal (pista 7); doente 1, tumor Gleason 7 (pista 8); doente 2, tecido adjacente normal (pista 9); doente 2, tumor Gleason 9 (pista 10); doente 3, tecido adjacente normal (pista 11); doente 3, tumor Gleason 7 (pista 12); doente 4, tecido adjacente normal (pista 13); doente 4, tumor Gleason 7 (pista 14).

FIG. 9A. Expressão de PHOR-1 em cancro da próstata, apresentando regulação positiva por análise de Northern em 5 de 7 (ou 8 de 10, quando combinado com

FIG. 9B) espécimes de tumor. São apresentadas amostras compatíveis de doente com tumor (T) e normal (N) para os seguintes tipos de tumor: Gleason 7 (pista par 1); Gleason 9 (pista par 2); Gleason 7 (pista pares 3-5); Gleason 6 (pista pares 6-7); B representa hiperplasia prostática benigna (BPH); N representa espécimes normais adicionais.

FIG. 9B. Expressão de PHOR-1 em cancro da próstata, apresentando regulação positiva por análise de transferência de gota em 3 de 3 (ou 8 de 10, quando combinado com FIG. 9A) espécimes de tumor. São apresentadas amostras de doentes compatíveis de tumor (T) e normal (N) para os seguintes tipos de tumor: Gleason 7 (par de gotas 8); Gleason 8 (par de gotas 9); Gleason 7 (par de gotas 10).

FIG. 10. Expressão de PHOR-1 em cancros humanos demonstrada por análise de transferência de gota de RNA tumoral (T) e RNA normal (N) amostras compatíveis utilizando cDNAs amplificados derivados do doente. A regulação positiva de expressão de PHOR-1 foi encontrada em 3 de 3 doentes de cancro da próstata, 6 de 14 doentes de cancro do rim, 2 de 8 doentes de cancro uterino, 3 de 8 doentes de cancro do estômago e 7 de 7 doentes de cancro do recto.

FIG. 11A. Fotomicrografia apresentando a expressão de PHOR-1 em neoplasia intraepitelial prostática (PIN)

através de hibridação *in situ* com uma ribo-sonda de PHOR-1 anti-sentido.

FIG. 11B. Fotomicrografia apresentando expressão de PHOR-1 em tecido de cancro da próstata através de hibridação *in situ* com uma ribo-sonda de PHOR-1 anti-sentido.

FIG. 12A. Fotomicrografia apresentando expressão de PHOR-1 em cancro da próstata através de hibridação *in situ* com uma ribo-sonda PHOR-1 anti-sentido. Note-se a regulação positiva da expressão relativa em relação à próstata normal, FIG. 12B.

FIG. 12B. Fotomicrografia apresentando expressão de PHOR-1 em próstata normal através de hibridação *in situ* com uma ribo-sonda PHOR-1 anti-sentido.

FIG. 13A. Expressão e detecção de proteína PHOR-1 em células PHOR-1-293T. Células 293T foram transfectadas transientemente com 10 µg de qualquer um de plasmídeo pCDNA4 HIS MAN PHOR-1, que contém um epitopo Express e HIS tag fundido com o terminal N da sequência PHOR-1, ou o vector de controlo e ensaiado para a expressão da proteína PHOR-1 através de citometria de fluxo. Para a detecção por citometria de fluxo da proteína PHOR-1, células 293T transfectadas com PHOR-1 e vector de controlo foram recolhidas 2 dias após transfecção e coradas com 10 µg/mL de mAb anti-Express (Invitrogen)

seguido por conjugado FITC anti-ratinho e depois analisados num citómetro de fluxo Coulter EPICS XL. Estão indicados com setas os perfis de fluorescência respectivos de populações celulares de controlo (linha a cheio) e transfectados com PHOR-1 (linha a tracejado). Estes resultados demonstram expressão na superfície da célula e o reconhecimento da proteína PHOR-1 em células transfectadas.

FIG. 13B. Expressão e detecção de proteína PHOR-1 em células PHOR-1-293T. As células 293T foram transfectadas como descrito para a FIG. 13A, e ensaiadas para a expressão da proteína PHOR-1 por imunoprecipitação (IP) e transferência de western. Para análises de imunoprecipitação e de western, as células de PHOR-1 e vector controlo foram recolhidas e lisadas quer em tampão RIPA (Tris a 25 mM pH 7,5, NaCl a 150 mM, Triton-X 100 a 1%, desoxicolato de sódio a 0,5%, SDS a 1%, EDTA a 2 mM, 100 µg/mL de PMSF, 2 µg/mL de leupeptina, e 2 mM de ortovanadato de sódio) para imunoprecipitação ou em tampão de amostra de 2X SDS-PAGE para análise de western do lisado celular total (WCL). Os lisados de RIPA foram pré-clarificados com esferas de proteína G agarose e depois imunoprecipitados com 4 µg de pAb de coelho anti-péptido de PHOR-1 purificado por afinidade e esferas de agarose de proteína G. A proteína PHOR-1 imunoprecipitada (IP) e a proteína PHOR-1 presente nos lisados celulares totais (WCL) foi detectada por análise de western com

mAb anti-express seguido por anticorpo secundário HRP anti-ratinho de cabra e visualizada por intensificação da quimioluminescência e exposição a película autorradiográfica. A seta indica a proteína prevista de 37 kD PHOR-1 marcada no epitopo detectada pelo mAb anti-Express. Um arrasto de peso molecular elevado também foi detectado em células transfectadas com PHOR-1, mas não em células controlo, que podem representar agregados da proteína PHOR-1 induzida pela associação de regiões de transmembrana hidrofóbicas. Estes resultados demonstram expressão na superfície celular e reconhecimento da proteína PHOR-1 em células transfectadas.

Fig. 14A. Detecção, por citometria de fluxo, da expressão na superfície celular da proteína PHOR-1 por um anticorpo policlonal específico para PHOR-1. O péptido pAb anti-PHOR-1 purificado por afinidade, criado para os aminoácidos 1-14 da sequência de PHOR-1 foi utilizado para detectar proteína PHOR-1 marcada no epitopo expressada em células 293T transfectadas transientemente. As células 293T foram transfectadas com qualquer vector controlo ou plasmídeo pCDNA4 HIS-MAX PHOR-1 (10 µg) e recolhidas 2 dias mais tarde. As células foram então coradas com 10 µg/mL de mAb anti-Express seguido por Ab secundário anti-ratinho conjugado com FITC e analisado num citómetro de fluxo Coulter EPICS XL. São indicados com setas os perfis fluorescentes respectivos das populações celulares de

controle (linha a tracejado) e transfectadas com PHOR-1 (linha a cheio).

Fig. 14B. Detecção, por citometria de fluxo, da expressão na superfície celular da proteína PHOR-1 por um anticorpo policlonal específico para PHOR-1. O péptido pAb anti-PHOR-1 purificado por afinidade, criado para os aminoácidos 1-14 da sequência de PHOR-1 foi utilizado para detectar proteína PHOR-1 marcada no epitopo expressada em células 293T transfectadas transientemente. As células 293T foram transfectadas com qualquer vector de controle ou plasmídeo pCDNA4 HIS-MAX PHOR-1 (10 µg) e recolhidas 2 dias mais tarde. As células foram então coradas com 10 µg/mL de pAb anti-PHOR-1 de coelho purificado por afinidade seguido por Ab secundário conjugado com FITC anti-coelho e analisado num citómetro de fluxo Coulter EPICS XL. Estão indicados com setas os perfis fluorescentes das respectivas populações celulares de controle (linha a tracejado) e transfectadas com PHOR-1 (linha a cheio).

FIG. 15. Reactividade específica para PHOR-1 de soro derivado de ratinhos imunizados com antigénio GST-PHOR-1. Ratinhos Balb C foram imunizados com uma proteína de fusão glutathiona-S-transferase (GST)-PHOR-1 codificando para os aminoácidos 86-310 da sequência da proteína PHOR-1. A reactividade específica de soro de ratinho imunizado para a sequência da proteína PHOR-1 foi determinada por transferência de western

utilizando uma proteína de ligação à maltose (MBP)-PHOR-1 proteína de fusão codificando os mesmos aminoácidos como antígeno alvo. Uma diluição de 1:500 de uma amostra de sangue de teste representativa foi utilizada para pesquisar com sonda uma transferência de várias quantidades de proteína MBP-PHOR-1 purificada (2 μ L= $\sim$ 100 ng de proteína de fusão) e lisados de bactérias induzidas. É apresentado reconhecimento específico da proteína MBP-PHOR-1 demonstrando anticorpos específicos para PHOR-1 no soro de ratinhos imunizados.

FIG. 16A. Detecção de expressão de PHOR-1 na superfície celular em células tumorais LNCaP. As células LNCaP foram coradas com uma diluição 1:200 de uma combinação de soros derivados de ratinho imunizado com GST-PHOR-1 ou com soros de ratinho pré-imunizados seguido por anticorpo secundário anti-ratinho conjugado com FITC anti-ratinho. As células coradas foram então analisadas num citómetro de fluxo Coulter EPICS XL. Estão indicados com setas os respectivos perfis de fluorescência de populações de células coradas com soro pré-imune (linha a cheio) ou soros imunizados com GST-PHOR-1 (linha a tracejado). Estes resultados demonstram o reconhecimento de expressão na superfície celular endógena de PHOR-1 em células de cancro da próstata LNCaP.

FIG. 16B. Detecção de expressão de PHOR-1 na

superfície celular em células tumorais LAPC9. As células tumorais LAPC9 preparadas a partir de um xenoenxerto de ratinho LAPC9 SCID foram coradas com uma diluição 1:200 de uma combinação de soros derivados de ratinhos imunizados com GST-PHOR-1 ou com soros pré-ímenes de ratinho seguidos por anticorpo secundário anti-ratinho conjugado com FITC anti-ratinho. As células coradas foram então analisadas num citómetro de fluxo Coulter EPICS XL. Estão indicados com setas os respectivos perfis fluorescentes de populações de células coradas com soros pré-ímenes (linha a cheio) ou soros imunizados por GST-PHOR-1 (linha a tracejado). Estes resultados demonstram o reconhecimento da expressão endógena na superfície celular de PHOR-1 em células de cancro da próstata LAPC9.

FIG. 17. Expressão de PHOR-1 avaliada por tradução *in vitro* livre de células. O cDNA de controlo e o cDNA de PHOR-1 foram traduzidos *in vitro* utilizando lisados de reticulócito de coelho. O ensaio de tradução *in vitro* sem células demonstra que o cDNA de PHOR-1 é traduzido numa proteína 38-42 kDa, que corresponde ao peso molecular calculado de PHOR-1.

FIG. 18A. Fotomicrografia apresentando análise imuno-histoquímica utilizando anticorpo policlonal de coelho anti-PHOR-1 (péptido 1; aminoácidos 1-14) em tecidos de cancro da próstata fixados com formalina e embebidos em parafina.

FIG. 18B. Fotomicrografia apresentando análise imuno-histoquímica utilizando anticorpo policlonal de coelho anti-PHOR-1 (péptido 1; aminoácidos 1-14) na linha celular de cancro da próstata, LNCaP fixada com formalina e embebida em parafina.

FIG. 18C. Fotomicrografia apresentando análise imuno-histoquímica utilizando anticorpo policlonal de coelho anti-PHOR-1 (péptido 1; aminoácidos 1-14) em tecidos de cancro da próstata fixados com formalina e embebidos em parafina.

FIG. 18D. Fotomicrografia apresentando análise imuno-histoquímica utilizando anticorpo policlonal de coelho anti-PHOR-1 (péptido 1; aminoácidos 1-14) em próstata normal fixada com formalina e embebida em parafina.

FIG. 18E. Fotomicrografia apresentando análise imuno-histoquímica utilizando anticorpo policlonal de coelho anti-PHOR-1 (péptido 1; aminoácidos 1-14) em tecidos de cancro da próstata fixados com formalina e embebidos em parafina.

FIG. 18F. Fotomicrografia apresentando análise imuno-histoquímica utilizando anticorpo policlonal de coelho anti-PHOR-1 (péptido 1; aminoácidos 1-14) em próstata normal fixada com formalina e embebida em parafina.

FIG. 19A. Fotomicrografia apresentando análise imuno-histoquímica utilizando anticorpo policlonal de coelho anti-PHOR-1 (péptido 1; aminoácidos 1-14) em células 293T fixadas com formalina e embebidas em parafina.

FIG. 19B. Fotomicrografia apresentando análise imuno-histoquímica utilizando anticorpo policlonal de coelho anti-PHOR-1 (péptido 1; aminoácidos 1-14) em células 293T modificadas para expressar PHOR-1, fixadas com formalina e embebidas em parafina.

FIG. 19C. Fotomicrografia apresentando análise imuno-histoquímica utilizando anticorpo policlonal de coelho anti-PHOR-1 (péptido 1; aminoácidos 1-14) em células PC3 fixadas com formalina e embebidas em parafina.

FIG. 19D. Fotomicrografia apresentando análise imuno-histoquímica utilizando anticorpo policlonal de coelho anti-PHOR-1 (péptido 1; aminoácidos 1-14) em células PC3 modificadas para expressar PHOR-1, fixadas com formalina e embebidas em parafina.

FIG. 19E. Fotomicrografia apresentando análise imuno-histoquímica utilizando anticorpo policlonal de coelho anti-PHOR-1 (péptido 1; aminoácidos 1-14) em tecido de cancro da próstata fixado com formalina e embebido em parafina.

FIG. 19F. Fotomicrografia apresentando análise imuno-

histoquímica utilizando anticorpo policlonal de coelho anti-PHOR-1 (péptido 1; aminoácidos 1-14) em células LNCaP fixadas com formalina e embebidas em parafina.

FIG. 20A. Análise de Western de alteração da fosforilação da tirosina por PHOR-1. Células PC3, expressando de forma estável quer neo ou PHOR-1 no vector pSRa retroviral foram cultivadas em FBS a 1% durante a noite. As células foram ou deixadas não tratadas ou foram tratadas com 10% de FBS durante 3 min. As células foram lisadas e analisadas por transferência de western com antifosfotirosina (UBI, Lake Placid, NY).

FIG. 20B. Análise de Western da alteração de fosforilação de Erk por PHOR-1. Células PC3, expressando de forma estável ou neo ou PHOR-1 no vector pSRa retroviral foram processadas como descrito para a FIG. 19A. As células foram lisadas e analisadas por transferência de western com mAb anti-phospho-ERK (Cell Signal, Beverly, MA).

FIG. 20C. Células PC3 preparadas como descrito para as FIGS. 19A-B foram também pesquisadas com sonda para Grb2. A sobreposição de mAb Anti-Grb2 (Transduction Laboratories, San Diego, CA) demonstra carga proteica igual.

FIG. 20D. Análise de Northern de células PC3-neo e

PC3-PHOR-1. As células PC3 descritas nas FIGS. 19A-C acima foram avaliadas para expressão de PHOR-1 por transferência de northern. O RNA foi extraído das células PC3-neo de controlo e as células PC3 foram transduzidas de forma estável com PHOR-1 e as transferências de RNA foram hibridadas utilizando a sonda PHOR-1 (fragmento *Xba-Ecor1* do clone GTH10). O RNA de xenoenxertos LAPC4 foi utilizado como um controlo positivo (ver FIG. 20). Os resultados demonstram que o mRNA de PHOR-1 é expressado em células retrovirais transduzidas PC3-PHOR-1, mas não em células de controlo.

FIG. 20E. Transferência de Northern apresentando expressão de PHOR-1 em xenoenxertos LAPC4. A forte expressão é observada na LAPC4 dependente de androgénio (AD), mas não na LAPC4 independente de androgénio (AI).

FIG. 21A. células NIHI-3T3 expressando PHOR-1 de forma estável foram analisadas quanto à sua capacidade para formar colónias em agar mole. Células NTH-3T3, expressando neo de forma estável foram utilizadas como controlos negativos. A experiência foi realizada em duplicado. O ensaio foi avaliado 4 semanas após o plaqueamento das células.

FIG. 21B. Células NIH-3T3 expressando de forma estável PHOR-1 foram analisadas quanto à sua capacidade para

formar colónias em agar mole. A experiência foi realizada em duplicado. O ensaio foi avaliado 4 semanas após o plaqueamento das células. A contagem de colónias demonstra que PHOR-1 induz um aumento de 3 vezes na formação de colónias relativa ao controlo neo (FIG. 21A). Este aumento significativo foi observado em 2 experiências separadas. Os resultados indicam que a expressão de PHOR-1 em células NIH 3T3 induz um aumento de 3-4 vezes na formação de colónia em comparação com um aumento de 5 vezes pelo oncogene forte Ras (ver FIG. 21C), sugerindo que PHOR-1 possui capacidades de transformação significativas.

FIG. 21C. Células NIH-3T3 expressando de forma estável PHORI foram analisadas quanto à sua capacidade para formar colónias em agar mole (FIG. 21B). Células NIH-3T3, expressando de forma estável Ras activado foram utilizadas como controlos positivos. A experiência foi realizada em duplicado. O ensaio foi avaliado 4 semanas após o plaqueamento das células.

FIG. 22. Sequências de nucleótidos (SEQ ID NO: 6) e de aminoácidos da ORF deduzida (SEQ ID NO: 7) de AI138218, um membro da família PHOR-1.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A invenção proporciona um novo receptor acoplado a proteína G específico para a próstata regulado positi-

vamente em cancro da próstata, denominado PHOR-1. PHOR-1 parece ser expressado exclusivamente na próstata, e é marcadamente regulado positivamente em tumores da próstata. A expressão de PHOR-1 em amostras de próstata normal/tumoral compatíveis de doentes de cancro da próstata avançados, utilizando tanto métodos de detecção de mRNA e de proteína, apresenta um grau elevado de expressão regulada positivamente no tecido tumoral, sugerindo que PHOR-1 é um marcador útil para detecção de cancro da próstata. Adicionalmente, a expressão de PHOR-1 induz o crescimento de colónias, fosforilação da tirosina, e modulação de cAMP dos modos indicadores de um papel funcional em tumorigénese e transformação, proporcionando um alvo estratégico para terapia de cancro.

A proteína PHOR-1 é homóloga a uma família grande de receptores olfactivos que são expressados no epitélio olfactivo e nos neurónios. A orientação da superfície celular e a natureza deste receptor acoplado à proteína G apresenta várias abordagens terapêuticas utilizando moléculas que têm como alvo PHOR-1 e a sua função. Estas abordagens terapêuticas incluem terapia de anticorpo com anticorpos anti-PHOR-1, terapias de molécula pequena, e terapias de vacina. Adicionalmente, dada a sua expressão regulada positivamente em cancro da próstata, PHOR-1 é útil como um marcador de diagnóstico, determinação do estágio e/ou prognóstico para cancro da próstata e, de um modo semelhante, pode servir como um marcador para outros cancros expressando este receptor.

Salvo definido em contrário, todos os termos da técnica, anotações e outra terminologia científica aqui utilizados pretendem possuir os significados normalmente entendidos pelos especialistas na técnica á qual esta invenção pertence. Em alguns casos, os termos com significados normalmente entendidos são aqui definidos para clareza e/ou para referência rápida, e a inclusão dessas definições aqui apresentadas não deve necessariamente ser entendida como representando uma diferença substancial em relação aquela que é geralmente entendida na técnica. As técnicas e processos aqui descritos ou referenciados são geralmente bem entendidos e normalmente empregues utilizando metodologia convencional pelos especialistas na técnica, tais como, por exemplo, as metodologias de clonagem molecular vastamente utilizadas descritas em Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2ª edição (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Como apropriado, os processos envolvendo a utilização de estojos ("kits") comercialmente disponíveis e reagentes são geralmente realizados de acordo com protocolos e/ou parâmetros definidos pelo fabricante, salvo referência em contrário.

Como aqui utilizado, os termos "cancro da próstata avançado", "cancro da próstata localmente avançado", "doença avançada" e "doença localmente avançada" significa cancros da próstata que se estenderam através da cápsula da próstata, e pretendem incluir o estágio C da

doença segundo o sistema da American Urological Association (AUA), o estágio C1 C2 da doença segundo o sistema Whitmore-Jewett, e o estágio T3 - T4 e N+ da doença segundo o sistema TNM (tumor, nódulo, metástase). Em geral, a cirurgia não é recomendada para doentes com doença localmente avançada, e estes doentes têm resultados finais substancialmente menos favoráveis em comparação com doentes que possuem cancro da próstata clinicamente localizada (confinado ao órgão). A doença localmente avançada é clinicamente identificada por evidência palpável de duração para além da fronteira lateral da próstata, ou assimetria ou endurecimento acima da base da próstata. O cancro da próstata localmente avançado é presentemente diagnosticado patologicamente seguindo prostatectomia radical se o tumor invade ou penetra na cápsula prostática, estende-se para a margem cirúrgica, ou invade as vesículas seminais.

Como aqui utilizados, os termos "cancro da próstata metastático" e "doença metastática" significa cancros da próstata que se disseminaram para os nódulos linfáticos regionais ou para sítios distantes, e pretendem incluir o estágio D da doença segundo o sistema AUA e estágio TxNxM+ segundo o sistema TNM. Como é o caso com cancro da próstata localmente avançado, a cirurgia geralmente não é indicada para doentes com doença metastática, e a terapia hormonal (supressão de androgénios) é a modalidade de tratamento preferido. Doentes com cancro da próstata metastático eventualmente desenvolvem um estágio refractário de androgénio dentro de 12 a 18 meses do início

do tratamento, e aproximadamente metade destes doentes morre num espaço de 6 meses posteriores. O sítio mais comum para metástases do cancro da próstata é o osso. As metástases do cancro da próstata no osso são, equilibradamente, caracteristicamente osteoblásticas em vez de osteolíticas (*i.e.*, resultando na formação de osso puro). As metástases do osso são encontradas mais frequentemente na espinha, seguido pelo fémur, pélvis, caixa torácica, crânio e humero. Outros sítios comuns para metástases incluem nódulos linfáticos, pulmão, fígado e cérebro. O cancro da próstata metastático é tipicamente diagnosticado através de linfadenectomia pélvica aberta ou laparoscópica, rastreios de radionuclidos a todo o corpo, radiografia ao esqueleto, e/ou biopsia a lesão óssea.

Como aqui utilizado, o termo "polinucleótido" refere-se a uma forma polimérica de nucleótidos de pelo menos 10 bases ou pares de bases de comprimento, quer ribonucleótidos ou desoxinucleótidos ou uma forma modificada de qualquer tipo de nucleótido, e pretende incluir formas de cadeia simples e dupla de DNA.

Como aqui utilizado, o termo "polipéptido" significa um polímero de pelo menos 10 aminoácidos. Ao longo da especificação, são utilizadas as designações convencionais de três letras ou de letra única para aminoácidos.

Como aqui utilizados, os termos "hibridar",

"hibridação", "hibrida" e semelhantes, utilizados no contexto de polinucleótidos, pretendem referir-se a condições de hibridação convencionais, preferencialmente tais como hibridação em formamida a 50%/6X SSC/SDS a 0,1%/100 µg/mL de ssDNA, nas quais as temperaturas para hibridação são acima de 37 °C e as temperaturas para lavagem em 0,1XSSC/SDS a 0,1% são acima de 55 °C, e muito preferencialmente para condições de hibridação restritivas.

A "restringência" das reacções de hibridação é rapidamente determinável por um especialista na técnica, e geralmente é um cálculo empírico dependente do comprimento da sonda, da temperatura de lavagem, e da concentração salina. Em geral, sondas maiores requerem temperaturas mais elevadas para um emparelhamento apropriado, enquanto que sondas mais curtas necessitam de temperaturas mais baixas. A hibridação depende geralmente da capacidade do DNA desnaturado para reemparelhar quando as cadeias complementares estão presentes num ambiente abaixo da sua temperatura de fusão. Quanto mais alto for o grau de homologia desejado entre a sonda e a sequência hibridável, tanto mais elevada será a temperatura relativa que pode ser utilizada. Como resultado, segue-se que temperaturas relativas mais elevadas tenderiam a tornar as condições de reacção mais restritivas, enquanto de temperaturas mais baixas torná-las-ia menos. Para detalhes adicionais e explanação sobre restringência das reacções de hibridação, ver Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

"Condições restritivas" ou "condições de restrição elevada", como aqui definido, podem ser identificadas por aquelas que: (1) empregam força iônica baixa e temperatura elevada para lavagem, por exemplo cloreto de sódio a 0,015 M/citrato de sódio a 0,0015 M/dodecilsulfato de sódio a 0,1% a 50 °C; (2) empregam durante a hibridação um agente desnaturante, tal como formamida, por exemplo, 50% (v/v) de formamida com 0,1% de albumina de soro bovina/0,1% de Ficoll/0,1% de polivinilpirrolidona/tampão fosfato de sódio a 50 mM a pH 6,5 com 750 mM de cloreto de sódio, 75 mM de citrato de sódio a 42 °C; ou (3) empregam formamida a 50%, 5 x SSC (0,75 M NaCl, 0,075 M citrato de sódio), 50 mM de fosfato de sódio (pH 6,8), pirofosfato de sódio a 0,1%, solução de Denhardt a 5 x, DNA de espermatozoides de salmão sonificado (50 µg/mL), SDS a 0,1%, e sulfato de dextrano a 10% a 42 °C, com lavagens a 42 °C em 0,2 x SSC (cloreto de sódio/citrato de sódio) e formamida a 50% a 55 °C, seguido por uma lavagem de restrição elevada consistindo em 0,1 x SSC contendo EDTA a 55 °C.

"Condições de restrição moderada" podem ser identificados como descrito por Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluem a utilização de solução de lavagem e condições de hibridação (e.g., temperatura, força iônica e %SDS) menos restritivas do que as descritas acima. Um exemplo de condições de moderadamente restritivas é

incubação durante a noite a 37 °C numa solução compreendendo: formamida a 20%, 5 x SSC (NaCl a 150 mM, tricitrato de sódio a 15 mM), fosfato de sódio a 50 mM (pH 7,6), solução de Denhardt a 5 x, sulfato de dextrano a 10%, e 20 mg/mL de DNA de esperma de salmão fracturado desnaturado, seguido por lavagem dos filtros em 1 x SSC a cerca de 37-50 °C. O especialista na técnica irá reconhecer como ajustar a temperatura, força iónica, etc. conforme necessário para acomodar factores, tais como comprimento da sonda e semelhantes.

No contexto das comparações de sequências de aminoácidos, o termo "identidade" é utilizado para expressar a percentagem de resíduos de aminoácidos nas mesmas posições relativas que são iguais. Também neste contexto, o termo "homologia" é utilizado para expressar a percentagem de resíduos de aminoácidos nas mesmas posições relativas que são idênticas ou são semelhantes, utilizando os critérios de aminoácidos conservados da análise de BLAST, como é geralmente entendido na técnica. Por exemplo, os valores de % de identidade podem ser criados através de WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology*, 266: 460-480 (1996): <http://blast.wustl.edu/blast/README.html>). Outros detalhes relacionados com substituições de aminoácidos, que são consideradas conservadoras segundo esses critérios, são fornecidas abaixo.

Definições adicionais são proporcionadas ao longo das subsecções que se seguem.

POLINUCLEÓTIDOS PHOR-1

Um aspecto da invenção proporciona polinucleótidos correspondentes ou complementares à totalidade ou a parte de um gene, mRNA, e/ou sequência codificante de PHOR-1, preferencialmente na forma isolada, incluindo polinucleótidos codificando uma proteína PHOR-1 e fragmentos desta, DNA, RNA, híbrido DNA/RNA, e moléculas relacionadas, polinucleótidos ou oligonucleótidos complementares a um gene PHOR-1 ou sequência de mRNA ou uma parte desta, e polinucleótidos ou oligonucleótidos que hibridam com um gene PHOR-1, mRNA, ou para um polinucleótido codificando PHOR-1 (colectivamente, "polinucleótidos de PHOR-1"). Como aqui utilizado, o gene e proteína de PHOR-1 pretende incluir os genes PHOR-1 e as proteínas especificamente aqui descritas e os genes e proteínas correspondentes a outras proteínas PHOR-1 e variantes estruturalmente semelhantes das anteriores. Essas outras proteínas PHOR-1 e variantes geralmente possuirão sequências codificantes que são altamente homólogas à sequência codificante de PHOR-1, e preferencialmente partilharão pelo menos cerca de 50% de identidade de aminoácido e pelo menos cerca de 60% de homologia de aminoácidos (utilizando critérios BLAST), mais preferencialmente partilhando 70% ou mais homologia (utilizando critérios BLAST).

Uma forma de realização de um polinucleótido PHOR-1 é um polinucleótido PHOR-1 possuindo a sequência

apresentada na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 1). Um polinucleótido PHOR-1 pode compreender um polinucleótido possuindo a sequência de nucleótidos de PHOR-1 humano como apresentado na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 1), em que T também pode ser U; um polinucleótido que codifica a totalidade ou parte da proteína PHOR-1; uma sequência complementar às anteriores; ou um fragmento de polinucleótido de qualquer um dos anteriores. Outra forma de realização compreende um polinucleótido possuindo a sequência como apresentada na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 1), do resíduo de nucleótido número 133 até ao resíduo de nucleótido número 1083, ou desde o resíduo de nucleótido número 388 até ao resíduo de nucleótido número 1062, em que T também pode ser U. Outra forma de realização compreende um polinucleótido codificando um polipéptido PHOR-1 cuja sequência é codificada pelo cDNA contido no plasmídeo p101P3A11 conforme depositado na American Type Culture Collection em 2 de Julho de 1999 com o N° de Acesso PTA-312. Outra forma de realização compreende um polinucleótido que é capaz de hibridar em condições de hibridação restritivas com o cDNA de PHOR-1 humano apresentado na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 1) ou com um seu fragmento de polinucleótido.

Formas de realização típicas da invenção aqui reveladas incluem polinucleótidos PHOR-1 codificando porções específicas da sequência de mRNA de PHOR-1, tais como aquelas que codificam a proteína e seus fragmentos. Por exemplo, formas de realização representativas da invenção aqui reveladas incluem: polinucleótidos codificando

desde cerca do aminoácido 1 até cerca do aminoácido 10 da proteína PHOR-1 apresentada na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2), polinucleótidos codificando desde cerca do aminoácido 20 até cerca do aminoácido 30 da proteína PHOR-1 apresentada na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2), polinucleótidos codificando desde cerca do aminoácido 30 até cerca do aminoácido 40 da proteína PHOR-1 apresentada na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2), polinucleótidos codificando desde cerca do aminoácido 40 até cerca do aminoácido 50 da proteína PHOR-1 apresentada na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2), polinucleótidos codificando desde cerca do aminoácido 50 até cerca do aminoácido 60 da proteína PHOR-1 apresentada na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2), polinucleótidos codificando desde cerca do aminoácido 60 até cerca do aminoácido 70 da proteína PHOR-1 apresentada na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2), polinucleótidos codificando desde cerca do aminoácido 70 até cerca do aminoácido 80 da proteína PHOR-1 apresentada na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2), polinucleótidos codificando desde cerca do aminoácido 80 até cerca do aminoácido 90 da proteína PHOR-1 apresentada na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2) e polinucleótidos codificando desde cerca do aminoácido 90 até cerca do aminoácido 100 da proteína PHOR-1 apresentada na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2), etc. Seguindo este esquema, os polinucleótidos (de pelo menos 10 aminoácidos) codificando porções da sequência aminoácidos dos aminoácidos 100-317 da proteína PHOR-1 apresentada na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2) são formas de realização típicas da invenção. Polinucleótidos codificando porções maiores da proteína PHOR-1 estão também contempladas. Por exemplo polinucleótidos codificando desde cerca do aminoácido 1 (ou 20 ou 30 ou 40 etc.) até cerca do

aminoácido 20, (ou 30, ou 40 ou 50 etc.) da proteína PHOR-1 apresentada na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2) podem ser criados através de uma variedade de técnicas bem conhecidas na técnica.

Formas de realização ilustrativas adicionais da invenção aqui reveladas incluem fragmentos de polinucleótido de PHOR-1 codificando um ou mais dos motivos biológicos contidos na sequência da proteína PHOR-1. Numa forma de realização, fragmentos de polinucleótidos típicos da invenção podem codificar uma ou mais das regiões de PHOR-1 que apresentam homologia para HPRAJ70 ou RA1c, como apresentado na FIG. 2. Noutra forma de realização da invenção, fragmentos de polinucleótidos típicos podem codificar uma ou mais sequências de assinatura GPCR ou sequências de assinatura do receptor olfativo. Ainda noutra forma de realização da invenção, fragmentos de polinucleótidos típicos podem codificar sequências que são únicas para uma ou mais variantes de excisão alternativas de PHOR-1. Noutra forma de realização da invenção, fragmentos de polinucleótido típicos podem incluir uma porção da sequência de nucleótidos apresentada na SEQ ID NO: 1, por exemplo, desde o resíduo de nucleótido número 388 até ao resíduo de nucleótido número 1062, desde o resíduo de nucleótido número 159 até ao resíduo de nucleótido número 733, desde o resíduo de nucleótido número 854 até ao resíduo de nucleótido número 3136, ou desde o resíduo de nucleótido número 133 até ao resíduo de nucleótido número 1083.

Os polinucleótidos dos parágrafos precedentes possuem uma variedade de utilizações específicas diferentes. Como o PHOR-1 se apresenta como sendo sobre-expressado no cancro da próstata e em outros cancros, estes polinucleótidos podem ser utilizados em métodos de avaliação do estatuto dos produtos do gene PHOR-1 em tecidos normais versus tecidos cancerosos. Tipicamente, os polinucleótidos codificando regiões específicas da proteína PHOR-1 podem ser utilizados para avaliar a presença de perturbações (tais como deleções, inserções, mutações pontuais etc.) em regiões específicas (contendo essas regiões um domínio transmembranar) dos produtos do gene PHOR-1. Ensaio exemplificativo incluem ambos os ensaios RT-PCR bem como análise de polimorfismo de conformação de cadeia simples (SSCP) (ver e.g. Marrogi *et al.*, *J. Cutan. Pathol.* 26(8): 369-378 (1999), ambos os quais utilizam polinucleótidos codificando regiões específicas de uma proteína para examinar essas regiões na proteína. Ensaio e métodos para analisar sequências para detectar polimorfismos de nucleótidos únicos estão também disponíveis (Irizarry, *et al.*, 2000, *Nature Genetics* 26(2):223-236.

Outras formas de realização da invenção especificamente contempladas aqui reveladas são DNA genómico, cDNAs, ribozimas, e moléculas anti-sentido, incluindo moléculas anti-sentido de morfolino, bem como moléculas de ácido nucleico baseadas numa estrutura alternativa ou incluindo bases alternativas, quer derivadas de fontes naturais ou sintetizadas. Por exemplo, moléculas anti-

sentido podem ser RNAs ou outras moléculas, incluindo ácidos nucleicos de péptido (PNAs) ou moléculas de não ácido nucleico, tais como derivados de fosforotioato, que se ligam especificamente ao DNA ou RNA de um modo dependente dos pares de bases. Um especialista na técnica pode obter rapidamente estas classes de moléculas de ácido nucleico utilizando os polinucleótidos e sequências de polinucleótido de PHOR-1 aqui revelados.

A tecnologia anti-sentido integra a administração de oligonucleótidos eógenos que se ligam a um polinucleótido alvo localizado nas células. O termo "anti-sentido" refere-se ao facto de que esses oligonucleótidos são complementares aos seus alvos intracelulares, e.g., PHOR-1. Ver por exemplo, Jack Cohen, *OLIGODEOXYNUCLEOTIDES, Anti-sense Inhibitors of Gene Expression*, CRC Press, 1989; e *Synthesis* 1:1-5 (1988). Os oligonucleótidos anti-sentido PHOR-1 da presente invenção incluem derivados tais como S-oligonucleótidos (derivados fosforotioato ou S-oligos, ver, Jack Cohen, *supra*), que apresentam acção inibidora do crescimento do cancro aumentada. S-oligos (fosforotioatos de nucleósido) são análogos isoelectrónicos de um oligonucleótido (O-oligo) em que um átomo de oxigénio que não forma ponte do grupo fosfato é substituído por um átomo de enxofre. Os S-oligos da presente invenção podem ser preparados por tratamento dos O-oligos correspondentes com 3H-1,2-benzoditiol-3-ona-1,1-dióxido, que é um reagente de transferência de enxofre. Ver Iyer, R. P. *et al*, *J. Org. Chem.* 55:4693-4698 (1990); e Iyer, R. P. *et al.*, *J. Am.*

Chem. Soc. 112:1253-1254 (1990), cujas revelações são aqui incorporadas na sua totalidade por referência. Oligonucleótidos anti-sentido de PHOR-1 adicionais da presente invenção incluem oligonucleótidos anti-sentido morfolino conhecidos na técnica (ver e.g. Partridge *et al.*, 1996, *Anti-sense & Nucleic Acid Drug Development* 6: 169-175).

Os oligonucleótidos anti-sentido de PHOR-1 da presente invenção podem ser tipicamente RNA ou DNA que é complementar a e hibrida estavelmente com os primeiros 100 codões N-terminais ou os últimos 100 codões C-terminais, ou sobrepõem-se com o sítio de início ATG, do genoma de PHOR-1 ou o mRNA correspondente. Embora não seja necessária complementaridade absoluta, são preferidos graus de complementaridade elevados. A utilização de um oligonucleótido complementar a esta região permite a hibridação selectiva com mRNA de PHOR-1 e não com mRNA que especifique outras subunidades reguladoras da cinase de proteína. Preferencialmente, os oligonucleótidos anti-sentido de PHOR-1 da presente invenção são um fragmento 15 a 30-mero da molécula de DNA anti-sentido possuindo uma sequência que hibrida com o mRNA de PHOR-1. Opcionalmente, o oligonucleótido anti-sentido de PHOR-1 é um oligonucleótido 30-mero que é complementar a uma região nos primeiros 10 codões N-terminais e últimos 10 codões C-terminais de PHOR-1. Alternativamente, as moléculas anti-sentido são modificadas para empregar ribozimas na inibição da expressão de PHOR-1. L. A. Couture & D. T. Stinchcomb; *Trends Genet* 12: 510-515 (1996).

Outras formas de realização específicas deste aspecto da invenção incluem iniciadores e pares de iniciadores, que permitem a amplificação específica dos polinucleótidos da invenção ou de quaisquer partes específicas destes, e sondas que hibridam selectivamente ou especificamente com moléculas de ácido nucleico da invenção ou com qualquer parte destas. As sondas podem ser marcadas com um marcador detectável, tal como, por exemplo, um radioisótopo, composto fluorescente, composto bioluminescente, um composto quimioluminescente, quelante de metais ou enzima. Essas sondas e iniciadores podem ser utilizadas para detectar a presença de um polinucleótido PHOR-1 numa amostra e como um meio para detectar uma célula expressando uma proteína PHOR-1.

Exemplos dessas sondas incluem polipéptidos compreendendo a totalidade ou parte da sequência de cDNA de PHOR-1 humano apresentada na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 1). Exemplos de pares de iniciadores capazes de amplificar especificamente mRNAs de PHOR-1 estão também descritos nos Exemplos que se seguem. Como será entendido pelos especialistas na técnica, podem ser preparados muitos iniciadores e sondas diferentes, com base nas sequências aqui apresentadas e utilizados eficazmente para amplificar e/ou detectar um mRNA de PHOR-1.

Como aqui utilizado, diz-se que um polinucleótido está "isolado" quando está substancialmente separado dos

polinucleótidos contaminantes que correspondem ou são complementares aos genes diferentes do gene PHOR-1 ou que codificam polipéptidos diferentes do produto genético de PHOR-1 ou fragmentos destes. Um especialista na técnica pode empregar rapidamente processos de isolamento de ácido nucleico para obter um polinucleótido de PHOR-1 isolado.

Os polinucleótidos PHOR-1 da invenção são úteis para uma variedade de objectivos, incluindo, mas não estando limitados à sua utilização como sondas e iniciadores para a amplificação e/ou detecção do(s) gene(s) de PHOR-1, mRNA(s), ou fragmentos deste; como reagentes para o diagnóstico e/ou prognóstico de cancro da próstata e outros cancros; como ferramentas para identificar moléculas que inibem a entrada de cálcio especificamente para as células da próstata; como sequências codificantes capazes de dirigir a expressão de polipéptidos de PHOR-1; como ferramentas para modular ou inibir a expressão do(s) gene(s) PHOR-1 e/ou tradução do transcrito(s) de PHOR-1; e como agentes terapêuticos.

CARACTERÍSTICAS MOLECULARES E BIOQUÍMICAS DE PHOR-1

Como é descrito adiante nos Exemplos que se seguem, o gene e proteína PHOR-1 foram caracterizados de vários modos. Por exemplo, as análises de sequências de nucleótidos codificantes e de aminoácidos foram realizadas de modo a identificar elementos estruturais conservados na sequência de PHOR-1, características topológicas, modifi-

cações de pós-tradução, e moléculas potencialmente relacionadas. Foram realizadas RT-PCR, hibridação *in situ*, e análises de transferência de northern de expressão de mRNA de PHOR-1 de modo a estabelecer a gama de tecidos normais e cancerosos que expressam as várias mensagens de PHOR-1. Foram realizadas análise de transferência de Western e separação selectiva de células activada por fluorescência (FACS) de expressão da proteína PHOR-1 em células transfectadas experimentalmente para determinar a localização da superfície celular. PHOR-1 possui um pI de 8,7 e um peso molecular calculado de 35,2 kD.

PHOR-1 é um receptor acoplado a proteína G específico para a próstata (GPCR) expressado a níveis elevados em tumores da próstata avançados e localizados. A sequência da proteína PHOR-1 revela 7 domínios transmembranares potenciais e possui homologia com GPCRs envolvidos no olfacto (Raming *et al.*, 1993, *Nature* 361: 353; Malnic *et al.*, 1999, *Cell* 96:713). Um receptor olfactivo de rato expressado no cérebro, conhecido como RA1c (Raming *et al.*, 1998, *Receptor Channels* 6: 141), possui uma sequência com o grau de homologia mais elevado para PHOR-1. PHOR-1 é 59,9% idêntico a RA1c numa sobreposição de 299 resíduos. O homólogo humano provável de RA1c, HPRAJ70, também apresenta um grau de homologia semelhante para PHOR-1 (59,4% idêntico a HPRAJ70 ao longo de uma sobreposição de 298 resíduos). A proteína HPRAJ70 é relatada como sendo uma GPCR específica para a próstata (Patente US No. 5756309, Pedido PCT WO 96/39435). Os alinhamentos das sequências de aminoácidos de PHOR-1, HPRAJ70, e RA1c são apresentados na FIG. 1B.

A homologia de PHOR-1 com receptores olfactivos do cérebro conduziu à designação de Receptor-1 Olfactivo Homólogo da Próstata (PHOR-1). Proteínas que são membros desta família de receptores apresentam um terminal amino extracelular, três ansas extracelulares adicionais, três ansas intracelulares e um terminal carboxilo intracelular. A segunda região extracelular de PHOR-1 apresenta um sítio de N-glicosilação potencial no resíduo 90 (NSTT) sugerindo que a proteína pode ser glicosilada. As GPCRs são sete-receptores transmembranares que são estimulados por hormonas polipeptídicas ou moléculas pequenas. Os seus sinais são transmitidos através de proteínas de ligação triméricas guanina-nucleótido (proteínas G) às enzimas efectoras ou canais iónicos (Simon *et al.*, 1991, *Science* 252: 802).

Recentemente, as GPCRs também demonstraram estar ligadas a vias de sinalização mitogénicas de cinases de tirosina (Luttrell *et al.*, 1999, *Science* 283: 655; Luttrell *et al.*, 1999 *Curr Opin Cell Biol* 11: 177). As GPCRs são reguladas por fosforilação mediada por cinases de GPCR (GRKs), que são elas próprias indirectamente activadas pelas GPCRs (Pitcher *et al.*, 1998, *Ann. Rev. Biochem.* 67: 653). As GPCRs olfactivas transmitem os seus sinais através da activação da via cAMP através da ciclase de adenilato e da via da fosfolipase C criando 1,4,5-trisfosfato de inositol (IP3) e diacil-glicerol (DAG) (Breer, 1993, *Ciba Found Symp* 179: 97; Bruch, 1996, *Comp Biochem Physiol B*

Biochem Mol Biol 113:451). A criação de cAMP conduz à activação da proteína cinase A. A IP3 resulta num aumento do cálcio intracelular, enquanto que a DAG activa a proteína cinase C.

Como discutido em maior detalhe nos Exemplos que se seguem, PHOR-1 apresenta características funcionais de uma GPCR, como evidenciado pelo comportamento das células transfectadas com um vector para expressar PHOR-1. A expressão de PHOR-1 induz fosforilação da tirosina de uma proteína de 55 kDa e desfosforilação de uma proteína de 130 kDa, e também induz a fosforilação de Erk, uma cinase de proteína activada por mitogénio. A expressão de PHOR-1 modula a concentração de cAMP citoplásmico, como evidenciado pela acumulação de cAMP em resposta a soro de bovino fetal (FBS) por células que expressam PHOR-1. Adicionalmente, a expressão de PHOR-1 estimula o crescimento das colónias em agar mole.

A expressão de PHOR-1 é essencialmente específica para a próstata em tecidos humanos de adulto normal (FIGS. 5-7), com um nível de expressão muito baixo detectável por RT-PCR em ovário normal, bem como nível de expressão muito baixo detectável por transferência em gota de RNA em tecido cardíaco. No cancro da próstata, PHOR-1 é expressado em xenoenxertos tumorais passados em ratinhos SCID assim como amostras tumorais sujeitas a biópsia de doentes de cancro da próstata avançado (FIGS. 5-7). As comparações da expressão de PHOR-1 em conjuntos compatíveis de tecido

tumoral versus tecidos normais adjacentes recolhidos a partir de doentes de cancro da próstata avançado e doentes com cancro do rim, uterino, cervical, estômago e rectal, apresentaram nível de sobre-expressão muito elevado na grande maioria dos doentes (FIGS. 8-10), indicando nível elevado de regulação positiva em tecidos tumorais.

ISOLAMENTO DE MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO CODIFICANDO PHOR-1

As sequências de cDNA de PHOR-1 aqui descritas permitem o isolamento de outros polinucleótidos codificando produto(s) do gene PHOR-1, bem como o isolamento de polinucleótidos codificando homólogos do produto do gene PHOR-1, alternativamente isoformas excisadas, variantes alélicas, e formas mutantes do produto do gene PHOR-1. Vários métodos de clonagem molecular que podem ser empregues para isolar os cDNAs de comprimento total codificando um gene PHOR-1 são bem conhecidos (Ver, por exemplo, Sambrook, J. et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edição., Cold Spring Harbor Press, New York, 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*. Ausubel et al., Eds., Wiley e Sons, 1995). Por exemplo, metodologias de clonagem em fago lambda podem ser convenientemente empregues, utilizando sistemas de clonagem comercialmente disponíveis (e.g., Lambda ZAP Express, Stratagene). Os clones de fagos contendo cDNAs do gene PHOR-1 podem ser identificados pesquisando com sondas com cDNA de PHOR-1 marcado ou um fragmento deste. Por exemplo, numa forma de realização, o cDNA de PHOR-1 (FIG. 1A-D; SEQ ID NO: 1) ou

uma porção deste pode ser sintetizado e utilizado como uma sonda para recuperar os cDNAs sobreponíveis e de comprimento total correspondendo a um gene PHOR-1. O próprio gene PHOR-1 pode ser isolado através do rastreamento de bibliotecas de DNA genômico, bibliotecas de cromossomos artificiais bacterianos (BACs), bibliotecas de cromossomos artificiais de leveduras (YACs), e semelhantes, com sondas ou iniciadores de DNA de PHOR-1.

MOLÉCULAS DE DNA RECOMBINANTE E SISTEMAS DE HOSPEDEIRO-VECTOR

A invenção também proporciona moléculas de DNA recombinante ou RNA contendo um polinucleótido de PHOR-1, incluindo, mas não limitado a fagos, plasmídeos, fagemídeos, cosmídeos, YACs, BACs, bem como vários vetores virais e não virais bem conhecidas na técnica, e células transformadas ou transfectadas com essas moléculas de DNA recombinante ou RNA. Como aqui utilizado, uma molécula de DNA recombinante ou RNA é uma molécula de DNA ou RNA que foi sujeita a manipulação molecular *in vitro*. Métodos para criar essas moléculas são bem conhecidos (ver, por exemplo, Sambrook *et al*, 1989, *supra*).

A invenção proporciona ainda um sistema de hospedeiro-vector compreendendo uma molécula de DNA recombinante contendo um polinucleótido PHOR-1 numa célula hospedeira procariótica ou eucariótica adequada. Exemplos de células de hospedeiro eucariótico adequado incluem uma

célula hospedeira, uma célula vegetal, ou uma célula animal, tal como uma célula de mamífero ou uma célula de insecto (e.g., uma célula infectável com baculovírus, tal como uma célula Sf9). Exemplos de células de mamíferos adequadas incluem várias linhas celulares de cancro da próstata tais como LNCaP, PC-3, DU145, LAPC-4, TsuPr1, outras linhas celulares de cancro da próstata transfectáveis ou transduzíveis, bem como várias células de mamíferos utilizadas rotineiramente para a expressão de proteínas recombinantes (e.g., células COS, CHO, 293, 293T). Mais particularmente, um polinucleótido compreendendo a sequência codificante de um PHOR-1 pode ser utilizada para criar Proteínas PHOR-1 ou fragmentos desta utilizando qualquer número de sistemas de vector e hospedeiro utilizados rotineiramente e vastamente conhecidos na técnica.

Uma vasta gama de sistemas de vector e hospedeiro adequados para a expressão de proteínas PHOR-1 ou fragmentos desta estão disponíveis, ver por exemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*; *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, *supra*). Vectores preferidos para expressão em mamíferos incluem mas não estão limitados a pcDNA 3.1 myc-His-tag (Invitrogen) e ao vector retroviral pSRatKneo (Muller *et al.*, 1991, MCB 11:1785). Utilizando estes vectores de expressão, PHOR-1 pode ser preferencialmente expressado em várias linhas celulares de cancro da próstata e não próstata, incluindo por exemplo 293, 293T, rat-1, 3T3, PC-3, LNCaP e TsuPr1. Os sistemas de vector e

hospedeiro da invenção são úteis para a produção de uma proteína PHOR-1 ou seu fragmento. Esses sistemas de hospedeiro-vector podem ser empregues para estudar as propriedades funcionais de PHOR-1 e mutações de PHOR-1.

Proteínas codificadas pelos genes PHOR-1, ou por seus fragmentos, terão uma variedade de utilizações, incluindo, mas não limitadas à criação de anticorpos e em métodos para identificar ligandos e outros agentes e constituintes celulares que se ligam a um produto do gene PHOR-1. Anticorpos criados contra uma proteína PHOR-1 ou fragmento desta podem ser úteis em ensaios de diagnóstico e prognóstico, metodologias de imagem (incluindo, particularmente, sistemas de imagem para cancro), e métodos terapêuticos na gestão de cancros humanos caracterizados pela expressão de uma proteína PHOR-1, incluindo, mas não limitado a cancro da próstata. Estão contemplados vários ensaios imunológicos úteis para a detecção de proteínas PHOR-1, incluindo, mas não limitados a vários tipos de radioimunoensaios, ensaios de imunoabsorção ligados a enzima (ELISA), ensaios de imunofluorescência ligados a enzima (ELIFA), métodos imunocitoquímicos, e semelhantes. Esses anticorpos podem ser marcados e utilizados como reagentes de imagem imunológicos capazes de detectar células da próstata (e.g., em métodos de imagem de radiocintigrafia). Proteínas PHOR-1 também podem ser particularmente úteis na criação de vacinas para o cancro, como abaixo descrito em mais detalhe.

PROTEÍNAS PHOR-1

Outro aspecto da presente invenção proporciona proteínas PHOR-1 e fragmentos polipeptídicos destas. As proteínas PHOR-1 da invenção incluem aquelas aqui especificamente identificadas, bem como variantes alélicas, variantes de substituição conservativa e homólogos até ao ponto em que essas variantes e homólogos podem ser isolados/criados e caracterizados sem experimentação indesejável seguindo os métodos delineados abaixo. As proteínas de fusão que combinam partes de diferentes proteínas PHOR-1 ou fragmentos destas, bem como proteínas de fusão de uma proteína PHOR-1 e um polipéptido heterólogo, estão também incluídas. Essas proteínas PHOR-1 serão colectivamente referidas como as Proteínas PHOR-1, as proteínas da invenção, ou PHOR-1. Como aqui utilizado, o termo "polipéptido PHOR-1" refere-se a um fragmento de polipéptido ou a uma proteína PHOR-1 de pelo menos 10 aminoácidos, preferencialmente pelo menos 15 aminoácidos.

Uma forma de realização específica de uma proteína PHOR-1 compreende um polipéptido possuindo a sequência de aminoácidos de PHOR-1 humana como apresentado na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2), desde o resíduo de aminoácido número 1 até cerca do resíduo de aminoácido número 317 como aí apresentado. Outra forma de realização específica de uma proteína PHOR-1 compreende um polipéptido possuindo a sequência de aminoácidos de PHOR-1 humana como apresentado na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2), desde cerca do resíduo de

aminoácido número 86 até cerca do aminoácido número 310 como aí apresentado. Uma forma de realização específica de um fragmento de PHOR-1 compreende um péptido seleccionado a partir do grupo compreendendo os aminoácidos 1-14 da sequência da proteína PHOR-1 apresentada na FIG. 1A-D (MVDPNGNESSATYF; SEQ ID NO: 8), aminoácidos 262-274 da sequência de proteína PHOR-1 apresentada na FIG. 1A-D (VHRFSKRDRSPLP; SEQ ID NO: 9), e as porções extracelulares de PHOR-1 (aminoácidos 1-28, 86-99, 159-202 e 262-272 da SEQ ID NO: 2). Outras formas de realização específicas incluem um ou ambos os domínios transmembranares identificados na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2).

Em geral, variantes alélicas que ocorrem naturalmente de PHOR-1 humana partilharão um grau elevado de identidade e homologia estrutural (e.g., 90% ou mais de identidade). Tipicamente, variantes alélicas das proteínas PHOR-1 irão conter substituições de aminoácidos conservativas nas sequências de PHOR-1 aqui descritas ou irão conter uma substituição de um aminoácido de uma posição correspondente num homólogo de PHOR-1. Uma classe de variantes alélicas de PHOR-1 serão proteínas que partilham um grau elevado de homologia com pelo menos uma pequena região de uma sequência de aminoácidos de PHOR-1 particular, mas irá ainda conter uma saída radical da sequência, tal como uma substituição não conservativa, truncagem inserção ou desvio de grelha.

Substituições de aminoácidos conservativas podem

ser frequentemente realizadas numa proteína sem alterar nem a conformação nem a função da proteína. Essas alterações incluem substituir qualquer um de isoleucina (I), valina (V), e leucina (L) para qualquer outro desses aminoácidos hidrofóbicos; ácido aspártico (D) para ácido glutâmico (E) e vice versa; glutamina (Q) para asparagina (N) e vice versa; e serina (S) para treonina (T) e vice versa. Outras substituições podem também ser considerados conservativos, dependendo do ambiente do aminoácido particular e seu papel na estrutura tridimensional da proteína. Por exemplo, glicina (G) e alanina (A) podem frequentemente ser intermutáveis, assim como podem alanina (A) e valina (V). A metionina (M), que é relativamente hidrofóbica, pode ser frequentemente interpermutada com leucina e isoleucina, e pode vezes com valina. Lisina (K) e arginina (R) são frequentemente interpermutadas em localizações nas quais a característica significativa do resíduo de aminoácido é a sua carga e os diferentes pK's destes dois resíduos de aminoácidos não são significativos. Podem ser consideradas "conservativas" ainda outras alterações, em particular ambientes.

Proteínas PHOR-1, incluindo variantes, compreendem pelo menos um epitopo em comum com uma proteína PHOR-1 possuindo a sequência de aminoácidos da FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2), de modo a que um anticorpo que se liga especificamente a uma proteína PHOR-1 ou variante irá também ligar-se especificamente à proteína PHOR-1 possuindo a sequência de aminoácidos de FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2). Uma

classe de variantes de proteína PHOR-1 partilha 90% ou mais de identidade com a sequência de aminoácidos da FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2). Uma classe mais específica de variantes de proteína PHOR-1 compreende um domínio extracelular como identificado na FIG. 4. Variantes preferidas da proteína PHOR-1 são capazes de exibir uma ou mais das funções de GPCR aqui descritas, incluindo, por exemplo, a capacidade para modular a concentração de cAMP citossólico e a fosforilação da tirosina, e a capacidade para estimular o crescimento das colónias.

As proteínas PHOR-1 podem ser incorporadas em muitas formas de realização, preferencialmente na forma isolada. Como aqui utilizado, a proteína diz-se estar "isolada" quando são empregues métodos físicos, mecânicos ou químicos para remover a proteína PHOR-1 dos constituintes celulares que estão normalmente associados com a proteína. Um especialista na técnica pode empregar rapidamente métodos de purificação convencionais para obter uma proteína PHOR-1 isolada. Uma molécula de proteína PHOR-1 isolada será substancialmente isenta de outras proteínas ou moléculas que dificultam a ligação de PHOR-1 ao anticorpo ou outro ligando. A natureza e o grau de isolamento e purificação dependerão da utilização pretendida. Formas de realização de uma proteína PHOR-1 incluem uma proteína PHOR-1 purificada e uma proteína PHOR-1 funcional, solúvel. Numa forma, essas proteínas PHOR-1 funcionais, solúveis ou fragmentos destas retêm a capacidade para se ligarem ao anticorpo ou outro ligando.

A invenção também proporciona polipéptidos PHOR-1 compreendendo fragmentos biologicamente activos da sequência de aminoácidos de PHOR-1, tais como um polipéptido correspondente a parte das sequências de aminoácidos para PHOR-1 como apresentado na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2). Esses polipéptidos da invenção exibem propriedades da proteína PHOR-1, tais como a capacidade para induzir a criação de anticorpos que se ligam especificamente a um epitopo associado com a proteína PHOR-1.

Formas de realização da invenção aqui reveladas incluem uma vasta variedade de variantes de proteínas PHOR-1 aceites na técnica, tais como polipéptidos possuindo inserções, deleções e substituições de aminoácidos. As variantes de PHOR-1 podem ser preparadas utilizando métodos conhecidos na técnica, tais como mutagénese dirigida a um sítio, rastreio de alanina, e mutagénese de PCR. A mutagénese dirigida a um sítio [Carter *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 13:4331 (1986); Zoller *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 10:6487 (1987)], mutagénese em cassette [Wells *et al.*, *Gene*, 34:315 (1985)], mutagénese de selecção de restrição [Wells *et al.*, *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, 317:415 (1986)] ou outras técnicas conhecidas podem ser realizadas no DNA clonado para produzir o DNA da variante PHOR-1. Também pode ser empregue análise de rastreio de aminoácidos para identificar um ou mais aminoácidos ao longo de uma sequência contígua. Entre os aminoácidos de rastreio preferidos estão aminoácidos relativamente pequenos, neutros.

Esses aminoácidos incluem alanina, glicina, serina, e cisteína. A alanina é tipicamente um aminoácido de rastreo preferido entre este grupo porque elimina a cadeia lateral para além do carbono beta e é menos provável que altere a conformação da cadeia principal da variante. A alanina é também tipicamente preferida porque é o aminoácido mais comum. Além disso, encontra-se frequentemente tanto em posições escondidas como expostas [Creighton, *The Proteins*, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, *J. Mol. Biol.*, 150: 1 (1976)]. Se a substituição por alanina não produz quantidades adequadas da variante, pode ser utilizado um aminoácido isotérico.

Como discutido acima, formas de realização da invenção reivindicada incluem polipéptidos contendo menos de 317 sequências de aminoácidos da proteína PHOR-1 apresentada na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2). Por exemplo, formas de realização representativas da invenção aqui reveladas incluem polipéptidos consistindo em cerca do aminoácido 1 até cerca do aminoácido 10 da proteína PHOR-1 apresentada na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2), polipéptidos consistindo em cerca do aminoácido 20 até cerca do aminoácido 30 da proteína PHOR-1 apresentada na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2), polipéptidos consistindo em cerca do aminoácido 30 até cerca do aminoácido 40 da proteína PHOR-1 apresentada na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2), polipéptidos consistindo em cerca do aminoácido 40 até cerca do aminoácido 50 da proteína PHOR-1 apresentada na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2), polipéptidos consistindo em cerca do

aminoácido 50 até cerca do aminoácido 60 da proteína PHOR-1 apresentada na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2), polipéptidos consistindo em cerca do aminoácido 60 até cerca do aminoácido 70 da proteína PHOR-1 apresentada na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2), polipéptidos consistindo em cerca do aminoácido 70 até cerca do aminoácido 80 da proteína PHOR-1 apresentada na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2), polipéptidos consistindo em cerca do aminoácido 80 até cerca do aminoácido 90 da proteína PHOR-1 apresentada na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2) e polipéptidos consistindo em cerca do aminoácido 90 até cerca do aminoácido 100 da proteína PHOR-1 apresentada na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2), etc. Seguindo este esquema, os polipéptidos consistindo em porções da sequência de aminoácidos dos aminoácidos 100-317 da proteína PHOR-1 são formas de realização típicas da invenção. Polipéptidos consistindo em porções maiores da proteína PHOR-1 estão também contemplados. Por exemplo polipéptidos consistindo em cerca do aminoácido 1 (ou 20 ou 30 ou 40 etc.) até cerca do aminoácido 20, (ou 30, ou 40 ou 50 etc.) da proteína PHOR-1 apresentada na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2) podem ser criados através de uma variedade de técnicas bem conhecidas na técnica.

Formas de realização da invenção ilustrativas, adicionais aqui reveladas incluem polipéptidos PHOR-1 contendo os resíduos de aminoácidos de um ou mais dos motivos biológicos contidos na sequência do polipéptido PHOR-1 como apresentado na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2). Numa forma de realização, polipéptidos típicos da invenção podem

conter uma ou mais das regiões de PHOR-1 que exibem homologia com HPRAJ70 e/ou RA1c. Noutra forma de realização, polipéptidos típicos da invenção podem conter um ou mais dos sítios de N-glicosilação de PHOR-1, tais como NESS (SEQ ID NO: 10) nos resíduos 7-10 (numerando a partir do primeiro resíduo de aminoácidos apresentado na SEQ ID NO: 2), NLTI (SEQ ID NO: 11) nos resíduos 44-47 e/ou NSTT nos resíduos 90-93 (SEQ ID NO: 12). Noutra forma de realização, polipéptidos típicos da invenção podem conter um ou mais dos sítios de fosforilação de cAMP de PHOR-1, tais como RRDS nos resíduos 268-271 (SEQ ID NO: 13). Noutra forma de realização, polipéptidos típicos da invenção podem conter um ou mais sítios de fosforilação da proteína com cinase C de PHOR-1, tais como SKR nos resíduos 266-268. Noutra forma de realização, polipéptidos típicos da invenção podem conter um ou mais dos sítios de fosforilação com cinase II da caseína de PHOR-1, tais como SLHE nos resíduos 56-59 (SEQ ID NO: 14), SGID nos resíduos 69-72 (SEQ ID NO: 15), e/ou SGME nos resíduos 110-1113 (SEQ ID NO: 16). Noutra forma de realização, polipéptidos típicos da invenção podem conter um ou mais dos sítios de N-miristoilação, tais como GNESSA nos resíduos 6-11 (SEQ ID NO: 17), GLEEAQ nos resíduos 21-26 (SEQ ID NO: 18), GMESTV nos resíduos 111-116 (SEQ ID NO: 19), e/ou GTCVSH nos resíduos 240-245 (SEQ ID NO: 20). Noutra forma de realização, polipéptidos típicos da invenção podem conter uma ou mais das sequências de assinatura GPCR, tais como os resíduos de aminoácidos 112-128 de SEQ ID NO: 2, e/ou uma ou mais das sequências de assinatura do receptor olfativo, tais como os resíduos de

aminoácidos 61-82 e/ou 239-254 da SEQ ID NO: 2. Formas de realização relacionadas destas invenções incluem polipéptidos contendo combinações dos diferentes motivos discutidos acima sendo formas de realização preferidas aquelas que não contêm inserções, deleções ou substituições quer nos motivos ou nas sequências intervenientes desses polipéptidos.

Podem ser criados polipéptidos PHOR-1 utilizando tecnologia convencional de síntese de péptidos ou utilizando métodos de clivagem química bem conhecidos na técnica, com base nas sequências de aminoácidos das proteínas PHOR-1 humanas aqui reveladas. Alternativamente, podem ser utilizados métodos recombinantes para criar moléculas de ácido nucleico que codificam um fragmento de polipéptido de uma proteína PHOR-1. A este respeito, as moléculas de ácido nucleico codificando PHOR-1 aqui descritas proporcionam meios para criar fragmentos definidos de proteínas PHOR-1. Os polipéptidos PHOR-1 são particularmente úteis na criação e caracterização do domínio de anticorpos específicos (e.g., anticorpos que reconhecem um epítipo extracelular ou intracelular de uma proteína PHOR-1), na identificação de agentes ou factores celulares que se ligam a PHOR-1 ou um seu domínio estrutural particular, e em vários contextos terapêuticos, incluindo, mas não estando limitado a vacina para o cancro. Polipéptidos PHOR-1 contendo estruturas particularmente interessantes podem ser previstos e/ou identificados utilizando várias técnicas analíticas bem conhecidas na

técnica, incluindo, por exemplo, os métodos de análise de Chou-Fasman, Gamier-Robson, Kyte-Doolittle, Eisenberg, Karplus-Schultz ou Jameson-Wolf, ou na base de imunogenicidade. Fragmentos contendo essas estruturas são particularmente úteis na criação de anticorpos anti-PHOR-1 específicos para a subunidade ou na identificação de factores celulares que se ligam a PHOR-1.

Numa forma de realização específica descrita nos exemplos que se seguem, uma forma secretada de PHOR-1 pode ser convenientemente expressada em células 293T transfectadas com um vector de expressão conduzido por CMV codificando PHOR-1 com um marcador C-terminal 6XHis e MYC (pcDNA3.1/mycHIS, Invitrogen). A PHOR-1 marcada com HIS secretada para os meios de cultura pode ser purificada utilizando uma coluna de níquel e técnicas convencionais. Alternativamente, pode ser utilizado um sistema AP-marcador. São descritas várias construções para expressão de PHOR-1, nos exemplos abaixo.

Modificações de PHOR-1, tais como modificações covalentes, estão incluídas no âmbito desta invenção. Um tipo de modificação covalente inclui resíduos de aminoácidos direccionados de reacção de um polipéptido PHOR-1 com um agente derivado orgânico que é capaz de reagir com cadeias laterais seleccionadas ou os resíduos N- ou C-terminal de PHOR-1. Outro tipo de modificação covalente do polipéptido PHOR-1 incluído dentro do âmbito desta invenção compreende alterar o padrão de glicosilação

nativo do polipéptido. "Alterar o padrão de glicosilação nativo" é aqui pretendido para objectivos que significam eliminar uma ou mais unidades de hidratos de carbono encontrados na sequência nativa de PHOR-1 (quer para remover o sítio de glicosilação subjacente ou para eliminar a glicosilação através de meios químicos e/ou enzimáticos), e/ou adicionar um ou mais sítios de glicosilação que não estão presentes na sequência de PHOR-1 nativa. Adicionalmente, a frase inclui alterações qualitativas na glicosilação das proteínas nativas, envolvendo uma alteração na natureza e proporções de várias unidades de hidratos de carbono presentes. Outro tipo de modificação covalente de PHOR-1 compreende a ligação do polipéptido PHOR-1 a uma de uma variedade de polímeros não proteicos, e.g., polietilenoglicol (PEG), polipropilenoglicol, ou polioxiálquilenos, de um modo apresentado nas Patentes U.S. Nos. 4 640 835; 4 496 689; 4 301 144; 4 670 417; 4 791 192 ou 4 179 337.

A PHOR-1 da presente invenção pode também ser modificados de um modo a formar uma molécula quimérica compreendendo PHOR-1 fundido com outra sequência de polipéptido ou de aminoácido heteróloga. Numa forma de realização, uma tal molécula quimérica compreende uma fusão da PHOR-1 com um marcador de epitopo de poli-histidina, que proporciona um epitopo ao qual o níquel imobilizado se pode ligar selectivamente. O marcador do epitopo está geralmente colocado no terminal amino- ou carboxilo- da PHOR-1. Numa forma de realização alternativa, a molécula quimérica pode

compreender uma fusão da PHOR-1 com uma imunoglobulina ou uma região particular de uma imunoglobulina. Para uma forma bivalente da molécula quimérica (também referida como uma "imunoadesina"), uma tal fusão pode ser com uma região Fc de uma molécula de IgG. As fusões de Ig incluem preferencialmente a substituição de uma forma solúvel (domínio transmembranar eliminado ou inactivado) de um polipéptido PHOR-1 em vez de pelo menos uma região variável numa molécula de Ig. Numa forma de realização particularmente preferida, a fusão de imunoglobulina inclui as regiões da dobra, CH2 e CH3, ou a dobra, CH1, CH2 e CH3 de uma molécula IgG1. Para a produção de fusões de imunoglobulina ver também a Patente US No. 5 428 130 emitida em 27 de Junho de 1995.

ANTICORPOS CONTRA PHOR-1

Outro aspecto da invenção proporciona anticorpos que se ligam a proteínas e polipéptidos PHOR-1. Os anticorpos mais preferidos irão ligar-se selectivamente a uma proteína PHOR-1 e não se ligarão (ou irão ligar-se fracamente) a proteínas e polipéptidos não PHOR-1. Anticorpos anti-PHOR-1 que estão particularmente contemplados incluem anticorpos monoclonais e policlonais, assim como fragmentos contendo o domínio de ligação ao antigénio e/ou uma ou mais regiões determinantes de complementaridade destes anticorpos. Como aqui utilizado, um fragmento de anticorpo é definido como pelo menos uma porção da região variável da molécula de imunoglobulina que se liga ao seu alvo, *i.e.*, a região de ligação ao antigénio.

Para algumas aplicações, pode ser desejável criar anticorpos que reagem especificamente com uma proteína PHOR-1 particular e/ou um epitopo num domínio estrutural particular. Por exemplo, anticorpos preferidos úteis para objectivos de terapia e diagnóstico por sistema de imagem do cancro são aqueles que reagem com um epitopo numa região extracelular da proteína PHOR-1, como expressada em células de cancro. Esses anticorpos podem ser criados utilizando as proteínas PHOR-1 aqui descritas, ou utilizando péptidos derivados de seus domínios extracelulares previstos, como um imunogénio. A este respeito, com referência à sequência da proteína PHOR-1 apresentada na FIG 1, regiões na sequência amino-terminal para o domínio transmembranar pode ser seleccionada e utilizada para conceber imunogénios e reagentes de rastreio apropriados para criar e seleccionar anticorpos contra PHOR-1 extracelular específicos.

Os anticorpos da invenção contra PHOR-1 podem ser particularmente úteis em estratégias de cancro da próstata terapêuticos, ensaios de diagnóstico e prognóstico, e metodologias de sistemas de imagem. De um modo semelhante, esses anticorpos podem ser úteis no tratamento, diagnóstico, e/ou prognóstico de outros cancros, até ao ponto em que PHOR-1 é também expressada ou sobre-expressada noutros tipos de cancro. A invenção proporciona vários ensaios imunológicos úteis para a detecção e quantificação de PHOR-1 e proteínas e polipéptidos PHOR-1 mutantes. Tais ensaios compreendem geralmente um ou mais anticorpos contra PHOR-1

capazes de reconhecer e ligar uma proteína PHOR-1 ou mutante de PHOR-1, como apropriado, e pode ser realizada em vários formatos de ensaio imunológico bem conhecidos na técnica, incluindo, mas não estando limitados a vários tipos de radioimunoensaios, ensaios de imunoabsorção ligados a enzima (ELISA), ensaios de imunofluorescência ligados a enzima (ELIFA), e semelhantes. Adicionalmente, são também proporcionados pela invenção métodos de sistemas de imagem imunológicos capazes de detectar cancro da próstata, incluindo, mas não estando limitados a métodos de sistema de imagem por radiocintigrafia utilizando anticorpos contra PHOR-1 marcados. Tais ensaios podem ser utilizados clinicamente na detecção, monitorização, e prognóstico de cancro da próstata, particularmente cancro da próstata avançado.

Os anticorpos contra PHOR-1 também podem ser utilizados em métodos para purificar proteínas e polipeptídeos PHOR-1 e mutantes de PHOR-1 e para o isolamento de homólogos de PHOR-1 e moléculas relacionadas. Por exemplo, numa forma de realização, o método de purificar uma proteína PHOR-1 compreende incubar um anticorpo contra PHOR-1, que pode ser acoplado a uma matriz sólida, com um lisado ou outra solução contendo PHOR-1 em condições que permitem que o anticorpo contra PHOR-1 se ligue a PHOR-1; lavagem da matriz sólida para eliminar impurezas; e eluir a PHOR-1 do anticorpo acoplado. Outras utilizações dos anticorpos contra PHOR-1 da invenção incluem criar anticorpos anti-idiotípicos que mimetizam a proteína PHOR-1.

Os anticorpos contra PHOR-1 podem também ser utilizados terapêuticamente através de, por exemplo, modular ou inibir a actividade biológica de uma proteína PHOR-1 ou direccionando e destruindo células de cancro expressando uma proteína PHOR-1. A terapia de anticorpo da próstata e outros cancros é mais especificamente descrita numa subsecção separada abaixo.

São bem conhecidos na técnica vários métodos para a preparação de anticorpos. Por exemplo, os anticorpos podem ser preparados imunizando um hospedeiro de mamífero adequado utilizando uma proteína, péptido, ou fragmento de PHOR-1, na forma isolada ou imunoconjugada (*Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press, Eds., Harlow, e Lane (1988); Harlow, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Press, NY (1989)). Exemplos de imunogénios de proteína incluem PHOR-1 recombinante (expressada num sistema de baculovírus, sistema de mamíferos, etc.), domínio de PHOR-1 extracelular, PHOR-1 marcado com AP, etc. Adicionalmente, as proteínas de fusão de PHOR-1 também podem ser utilizadas, tal como uma fusão de PHOR-1 com GST, proteína de ligação a maltose (MBP), proteína verde fluorescente (GFP), HisMax-TOPO ou MycHis (ver Exemplos abaixo).

Numa forma de realização particular, uma proteína de fusão GST compreendendo a totalidade ou a maior parte da sequência de aminoácidos da grelha de leitura aberta da FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2) pode ser produzida e utilizada

como um imunogénio para criar anticorpos apropriados. Células que expressam ou sobre-expressam PHOR-1 podem também ser utilizadas para imunizações. De um modo semelhante, pode ser utilizada qualquer célula modificada para expressar PHOR-1. Essas estratégias podem resultar na produção de anticorpos monoclonais com capacidades aumentadas para reconhecer PHOR-1 endógena. Outro imunogénio útil compreende péptidos PHOR-1 ligados à membrana plasmática de células de eritrócitos de ovelha.

A sequência de aminoácidos de PHOR-1, como apresentado na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2) pode ser utilizado para seleccionar regiões específicas da proteína PHOR-1 para criar anticorpos. Por exemplo, as análises de hidrofobicidade e hidrofiliicidade da sequência de aminoácidos PHOR-1 podem ser utilizadas para identificar regiões hidrofílicas na estrutura de PHOR-1. As regiões da proteína PHOR-1 que apresentam estrutura imunogénica, assim como outras regiões e domínios, podem ser rapidamente identificadas utilizando vários outros métodos conhecidos na técnica, tais como análises de Chou-Fasman, Garnier Robson, Kyte-Doolittle, Eisenberg, Karplus-Schultz ou Jameson-Wolf. Péptidos de PHOR-1 previstos para se ligarem a HLA-A2 podem ser seleccionados para a criação de anticorpos. Como discutido nos exemplos abaixo, a imunogenicidade foi demonstrada com os aminoácidos 1-14 (MVDPNGNESSATYF; SEQ ID NO: 8), aminoácidos 262-274 (VHRFSKRKRRDSPLP; SEQ ID NO: 9) e aminoácidos 86-310 da sequência da proteína PHOR-1 (SEQ ID NO: 2), que foram utilizados para criar anticorpos

policlonais e monoclonais utilizando coelhos e ratinhos, respectivamente. Esta resposta de células B (produção de anticorpos) é o resultado de uma resposta inicial de células T induzida pelas porções imunogénicas de PHOR-1.

Métodos para preparar uma proteína ou polipéptido para utilização como um imunogénio e para a preparação de conjugados imunogénicos de uma proteína com um veículo, tais como BSA, KLH, ou outras proteínas veículos são bem conhecidos na técnica. Em algumas circunstâncias, pode ser utilizada a conjugação directa utilizando, por exemplo, reagentes de carbodiimida; noutras circunstâncias podem ser eficazes reagentes de ligação, tais como aqueles fornecidos por Pierce Chemical Co., Rockford, IL. A administração de um imunogénio de PHOR-1 é conduzida geralmente por injeção durante um período adequado e com a utilização de um adjuvante adequado, como é geralmente entendido na técnica. Durante o horário de imunização, os títulos de anticorpos podem ser calculados para determinar a adequabilidade da formação do anticorpo.

Os anticorpos monoclonais de PHOR-1 são preferidos e podem ser produzidos por vários meios bem conhecidas na técnica. Por exemplo, as linhas celulares imortalizadas que segregam um anticorpo monoclonal desejado pode ser preparado utilizando a tecnologia de hibridomas convencional de Kohler e Milstein ou modificações que imortalizam a produção de células B, como é geralmente conhecido. As linhas celulares de células imortalizadas que

segregam os anticorpos desejados são rastreadas por imunoensaio nos quais o antígeno é a proteína PHOR-1 ou fragmento de PHOR-1. Quando a cultura de células imortalizadas apropriadas que segregam o anticorpo desejado é identificada, as células podem ser expandidas e os anticorpos produzidos quer a partir de culturas *in vitro* ou a partir de líquido ascítico.

Os anticorpos ou fragmentos também podem ser produzidos, utilizando corrente tecnologia, por meios recombinantes. As regiões que se ligam especificamente às regiões da proteína PHOR-1 desejadas também podem ser produzidas no contexto de anticorpos quiméricos ou enxertados em CDR com origem em múltiplas espécies. Também podem ser produzidos anticorpos humanizados ou de PHOR-1 humana e são preferidos para utilização em contextos terapêuticos. São bem conhecidos métodos para humanizar anticorpos de murino e outros não humanos substituindo uma ou mais das CDRs de anticorpo não humano para as sequências de anticorpo humano correspondente (ver por exemplo, Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321: 522-525; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332: 323-327; Verhoeven *et al.*, 1988, *Science* 239:1534-1536). Ver também, Carter *et al.*, 1993, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89: 4285 e Sims *et al.*, 1993, *J. Immunol.* 151: 2296. Métodos para produzir anticorpos monoclonais totalmente humanos incluem apresentação em fagos e tecnologias de animais transgênicos (para revisão, ver Vaughan *et al.*, 1998, *Nature Biotechnology* 16: 535-539).

Podem ser criados anticorpos monoclonais contra PHOR-1 totalmente humanos utilizando tecnologias de clonagem empregando bibliotecas genéticas combinatórias de Ig humano grandes (*i.e.*, apresentação em fagos) (Griffiths e Hoogenboom, *Building an in vitro immune system: human antibodies from phage display libraries*. In: *Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications in Man*. Clark, M. (Ed.), Nottingham Academic, pp 45-64 (1993); Burton e Barbas, *Human Antibodies from combinatorial libraries*. *Id.*, pp 65-82). Também podem ser produzidos anticorpos monoclonais contra PHOR-1 totalmente humanos utilizando ratinhos transgênicos modificados para conter loci de genes de imunoglobulina humana como descritos no Pedido de Patente PCT W098/24893, Kucherlapati e Jakobovits *et al.*, publicado em 3 de Dezembro de 1997 (ver também, Jakobovits, 1998, *Exp. Opin. Invest. Drugs* 7(4): 607-614). Este método evita a manipulação *in vitro* necessária na tecnologia de apresentação em fagos e produzir eficientemente anticorpos humanos autênticos com elevada afinidade.

A reactividade de anticorpos contra PHOR-1 com uma proteína PHOR-1 pode ser estabelecida através de vários meios bem conhecidos, incluindo transferência de western, imunoprecipitação, ELISA, e análise de FACS utilizando, como apropriado, proteínas PHOR-1, péptidos, células que expressam PHOR-1 ou extractos destas.

Um anticorpo PHOR-1 ou fragmento deste da invenção pode ser marcado com um marcador detectável ou conjugado com uma segunda molécula, tal como uma citotoxina ou outro agente terapêutico, e utilizado para direccionar a segunda molécula para uma célula positiva para PHOR-1 (Vitetta, E.S. et al., 1993, *Immunotoxin therapy*, in DeVita, Jr., V.T. et al., eds., *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 4^a ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 2624-2636). Exemplos de agentes citotóxicos incluem, mas não estão limitados a ricina, cadeia A de ricina, doxorubicina, daunorubicina, taxol, brometo de etídio, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, di-hidroxi-antracina-9,10-diona, actinomicina, toxina da difteria, endotoxina de *Pseudomonas* (PE) A, PE40, abrina, cadeia A de abrina, cadeia A de modecina, alfa-sarcina, gelonina, mitogelina, retstrictocina, fenomicina, enomicina, curicina, crotina, caliqueamicina, inibidor de sapaonaria officinalis, e glucocorticóide e outros agentes quimioterapêuticos, bem como radioisótopos tais como ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y, e ¹⁸⁶Re. Marcadores detectáveis adequados incluem, mas não estão limitados a, um radioisótopo, um composto fluorescente, um composto bioluminescente, composto quimioluminescente, um quelante de metais ou uma enzima. Os anticorpos também podem ser conjugados com uma enzima de activação de pró-fármaco anti-cancro capaz de converter o pró-fármaco na sua forma activa. Ver, por exemplo, Patente US No. 4 975 287.

Para além disso, podem ser criados anticorpos bi-

específicos específicos para dois ou mais epitopos PHOR-1 utilizando métodos geralmente conhecidos na técnica. Para além disso, a função do anticorpo efector pode ser modificada para aumentar o efeito terapêutico dos anticorpos PHOR-1 em células de cancro. Por exemplo, podem ser modificados resíduos de cisteína na região Fc, permitindo a formação de pontes persulfureto intercadeia e a criação de homodímeros que pode possuir capacidades aumentadas para a internalização, ADCC e/ou morte das células mediada por complementos (ver, por exemplo, Caron *et al.*, 1992, *J. Exp. Med.* 176: 1191-1195; Shopes, 1992, *J. Immunol.* 148: 2918-2922). Os anticorpos homodiméricos também podem ser criados através de técnicas de ligação cruzada conhecidas na técnica (*e.g.*, Wolff *et al.*, *Cancer Res.* 53: 2560-2565).

ANIMAIS TRANSGÉNICOS PARA PHOR-1

Ácidos nucleicos que codificam PHOR-1 ou as suas formas modificadas podem também ser utilizados para criar quer animais transgénicos ou animais "knock out" que, por sua vez, são úteis no desenvolvimento e rastreio de reagentes terapeuticamente úteis. Um animal transgénico (*e.g.*, um ratinho ou rato) é um animal possuindo células que contêm um transgene, cujo transgene foi introduzido no animal ou um ancestral do animal num estágio pré-natal, *e.g.*, um estágio embrionário. Um transgene é um DNA que está integrado no genoma de um célula a partir da qual se desenvolve um animal transgénico. Numa forma de realização, o cDNA codificando PHOR-1 pode ser utilizado para clonar

DNA genómico codificando PHOR-1 de acordo com técnicas estabelecidas e as sequências genómicas utilizadas para criar animais transgênicos que contêm células que expressam DNA codificando PHOR-1.

Métodos para gerar animais transgênicos, particularmente animais tais como ratinhos ou ratos, tornaram-se convencionais na técnica e são descritos, por exemplo, na Patente U.S. Nos. 4 736 866 e 4 870 009. Tipicamente, células particulares seriam dirigidas para a incorporação do transgene de PHOR-1 com intensificadores específicos para o tecido. Animais transgênicos que incluem uma cópia de um transgene codificando PHOR-1 introduzida na linha germinal do animal num estágio embrionário podem ser utilizados para examinar o efeito da expressão de DNA aumentada codificando PHOR-1. Esses animais podem ser utilizados como animais de teste para reagentes que se pensa conferirem protecção contra, por exemplo, condições patológicas associadas à sua sobre-expressão. De acordo com esta faceta da invenção, um animal é tratado com o reagente e uma incidência reduzida da condição patológica, em comparação com animais não tratados contendo o transgene, indicaria uma intervenção terapêutica potencial para a condição patológica.

Alternativamente, homólogos não humanos de PHOR-1 podem ser utilizados para construir um animal "knock out" para PHOR-1 que possui um gene deficiente ou alterado codificando PHOR-1 como um resultado de recombinação homó-

loga entre o gene endógeno codificando PHOR-1 e ADN genómico alterado codificando PHOR-1 introduzido numa célula embrionária do animal. Por exemplo, o cDNA codificando PHOR-1 pode ser utilizado para clonar DNA genómico codificando PHOR-1 de acordo com técnicas estabelecidas. Uma porção do DNA genómico codificando PHOR-1 pode ser eliminada ou substituída por outro gene, tais como um gene codificando um marcador seleccionável que pode ser utilizado para monitorizar integração.

Tipicamente, vários quilobases de DNA flanqueador não alterado (em ambas as extremidades 5' e 3') estão incluídas no vector (ver e.g., Thomas e Capecchi, 1987, *Cell* 51:503 para uma descrição de vectores de recombinação homóloga). O vector é introduzido numa linha celular estaminal embrionária (e.g., através de electroporação) e são seleccionadas as células nas quais o DNA introduzido foi recombinado homologamente com o DNA endógeno (ver e.g., Li et al., 1992, *Cell* 69:915). As células seleccionadas são então injectadas num blastocisto de um animal (e.g., um ratinho ou rato) para formar quimeras de agregação (ver e.g., Bradley, em *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed., IRL, Oxford, 1987, pp. 113-152).

Um embrião quimérico pode ser então implantado num animal fêmea adoptiva pseudo-grávida adequada e o embrião aplicado para criar um animal "knock out". A progenia contendo o DNA homologamente recombinado nas suas

células germinais pode ser identificada através de técnicas convencionais e utilizado para criar animais nos quais todas as células do animal contêm o DNA recombinado homologicamente. Os animais knockout podem ser caracterizados por exemplo, quanto à sua capacidade para se defender contra certas condições patológicas e quanto ao seu desenvolvimento de condições patológicas devido à ausência do polipéptido de PHOR-1.

MÉTODOS PARA A DETECÇÃO DE PHOR-1

Outro aspecto da presente invenção refere-se a métodos para detectar polinucleótidos de PHOR-1 e proteínas PHOR-1 e suas variantes, bem como a métodos para identificar uma célula que expressa PHOR-1. O perfil de expressão altamente restringido ao tecido de PHOR-1 sugere que esta molécula pode servir como um marcador de diagnóstico para doença metastatizada. Neste contexto, o estado dos produtos do gene PHOR-1 podem proporcionar informação útil para prever uma variedade de factores incluindo susceptibilidade ao estado de doença avançada, taxa de progressão, e/ou agressividade do tumor. Como discutido em detalhe abaixo, o estado dos produtos do gene PHOR-1 em amostras de doentes pode ser analisado através de uma variedade de protocolos que são bem conhecidas na técnica incluindo análise imuno-histoquímica, a variedade de técnicas de transferência de northern, incluindo hibridação *in situ*, análise de RT-PCR (por exemplo em amostras micro-dissecadas por captura com laser), análise de transferência de western e análise por "array" de tecido.

Mais particularmente, a invenção proporciona ensaios para a detecção de polinucleótidos PHOR-1 numa amostra biológica, tais como tecido da próstata, tecido de rim, tecido uterino, espécimen cervical, tecido do estômago, tecido rectal, tecido ósseo, tecido linfático e outros tecidos, urina, sémen, sangue ou soro, preparações de células, e semelhantes. Polinucleótidos detectáveis para PHOR-1 incluem, por exemplo, um gene PHOR-1 ou fragmentos deste, mRNA de PHOR-1, variantes de excisão alternativa de mRNAs para PHOR-1, e moléculas de DNA recombinante ou RNA contendo um polinucleótido PHOR-1. São bem conhecidos na técnica vários métodos para amplificar e/ou detectar a presença de polinucleótidos PHOR-1 e podem ser empregues na prática deste aspecto da invenção.

Numa forma de realização, um método para detectar mRNA de PHOR-1 numa amostra biológica compreende produzir cDNA a partir da amostra por transcrição reversa utilizando pelo menos um iniciador; amplificar o cDNA assim produzido utilizando polinucleótidos PHOR-1 como iniciadores de sentido e anti-sentido para amplificar cDNAs de PHOR-1 aí apresentados; e detectar a presença do cDNA de PHOR-1 amplificado. Opcionalmente, a sequência do cDNA de PHOR-1 amplificado pode ser determinada. Noutra forma de realização, um método de detecção de um gene PHOR-1 numa amostra biológica compreende primeiro isolar DNA genómico a partir da amostra; amplificar o DNA genómico isolado utilizando polinucleótidos PHOR-1 como iniciadores de

sentido e anti-sentido para amplificar o gene PHOR-1 aí apresentado; e detectar a presença do gene PHOR-1 amplificado. Qualquer número de combinações de sonda de sentido e anti-sentido apropriadas podem ser concebidas a partir de sequências de nucleótidos proporcionadas para o PHOR-1 (FIG. 1A-D; SEQ ID NO: 1) e utilizadas para este objectivo.

A invenção também proporciona ensaios para detectar a presença de uma proteína PHOR-1 num tecido de outra amostra biológica tais como soro, osso, próstata, e outros tecidos, urina, preparações de células, e semelhantes, assim como ensaios citológicos para a detecção de células expressando PHOR-1. Métodos para detectar uma proteína PHOR-1 são também bem conhecidos e incluem, por exemplo, imunoprecipitação, análise imuno-histoquímica, análise de transferência de western, ensaios de ligação molecular e celular, ELISA, ELIFA e semelhantes. Por exemplo, numa forma de realização, um método de detecção da presença de uma proteína PHOR-1 numa amostra biológica compreende primeiro contactar a amostra com um anticorpo PHOR-1, um seu fragmento reactivo para PHOR-1, ou uma proteína recombinante contendo uma região de ligação ao antigénio de um anticorpo contra PHOR-1; e depois detectar a ligação da proteína PHOR-1 na amostra para esta.

São também proporcionados métodos para identificar uma célula que expressa PHOR-1. Numa forma de realização, um ensaio para identificar uma célula que expressa um gene PHOR-1 compreende detectar a presença de

mRNA de PHOR-1 na célula. Métodos para detecção de mRNAs particulares em células são bem conhecidos e incluem, por exemplo, ensaios de hibridação utilizando sondas de DNA complementares (tais como hibridação *in situ* utilizando ribo-sondas de PHOR-1 marcadas, transferência de northern e técnicas relacionadas) e vários ensaios de amplificação de ácido nucleico (tais como RT-PCR utilizando iniciadores complementares específicos para PHOR-1, e outros métodos de detecção tipo amplificação, tais como, por exemplo, DNA ramificado, SISBA, TMA e semelhantes). Alternativamente, um ensaio para identificar uma célula que expressa um gene PHOR-1 compreende detectar a presença de proteína PHOR-1 na célula ou secretada pela célula. São bem conhecidos na técnica vários métodos para a detecção de proteínas e podem ser empregues para a detecção de proteínas PHOR-1 e células que expressam PHOR-1.

A análise de expressão de PHOR-1 pode também ser útil como uma ferramenta para identificar e avaliar agentes que modulam a expressão do gene PHOR-1. Por exemplo, a expressão de PHOR-1 é restringida a próstata normal, assim como a câncros da próstata, rim, útero, cervical, estômago e recto, e PHOR-1 pode também ser expressado noutros câncros. A identificação de uma molécula ou agente biológico que pode inibir a expressão de PHOR-1 ou sobre-expressão em células de cancro pode ter valor terapêutico. Um tal agente pode ser identificado utilizando um rastreio que quantifica a expressão de PHOR-1 por RTPCR, hibridação e ácido nucleico ou ligação ao anticorpo.

MONITORIZAÇÃO DO ESTADO DE PHOR-1 E SEUS PRODUTOS

Os ensaios que avaliam o estado do gene PHOR-1 e produtos do gene PHOR-1 num indivíduo podem proporcionar informação sobre o crescimento ou potencial oncogénico de uma amostra biológica deste indivíduo. Por exemplo, porque o mRNA de PHOR-1 é tão altamente expressado em cancros da próstata, rim, uterino, cervical, do estômago e rectal, e não na maioria do tecido normal, ensaios que avaliam os níveis relativos de transcritos de mRNA de PHOR-1 ou proteínas numa amostra biológica podem ser utilizados para diagnosticar uma doença associada a desregulação de PHOR-1, tais como cancro, e pode proporcionar informação de prognóstico útil na definição de opções terapêuticas apropriadas. De um modo semelhante, os ensaios que avaliam a integridade de sequências de nucleótido e de aminoácidos de PHOR-1 numa amostra biológica, pode também ser utilizada neste contexto.

A descoberta que o mRNA de PHOR-1 é tão altamente expressado em cancros da próstata, e não na maioria do tecido normal, proporciona evidência de que este gene está associado com o crescimento celular desregulado e por isso identifica este gene e os seus produtos como alvos que o especialista na técnica pode utilizar para avaliar amostras biológicas de indivíduos suspeitos de possuírem uma doença associada a desregulação de PHOR-1. Noutro exemplo, porque a expressão de PHOR-1 está normalmente restringida à

próstata, também se podem avaliar amostras biológicas retiradas de outros tecidos para detectar a expressão de PHOR-1 como uma indicação de metástases. Neste contexto, a avaliação do estado da expressão do gene PHOR-1 e dos seus produtos podem ser utilizados para obter informação sobre o potencial de doença de uma amostra de tecido. Os termos "estado da expressão" neste contexto é utilizado para se referir, num sentido lato, à variedade de factores envolvidos na expressão, função e regulação de um gene e seus produtos, tais como o nível de expressão de mRNA, a integridade dos produtos de gene expressados (tais como as sequências nucleicas e de aminoácidos) e modificações de transcrição e tradução a estas moléculas.

O estado da expressão de PHOR-1 pode proporcionar informação útil para prever a susceptibilidade a estádios de doença particulares, progressão, e/ou agressividade do tumor. A invenção proporciona métodos e ensaios para determinar a expressão do estado de PHOR-1 e diagnosticar cancro que expressam PHOR-1, tais como cancro da próstata, mama, bexiga, pulmão, osso, cólon, pancreático, testicular, cervical e ovárico. O estado da expressão de PHOR-1 em amostras de doente podem ser analisados por vários meios bem conhecidos na técnica, incluindo sem limitação, análise imuno-histoquímica, hibridação *in situ*, análise de RT-PCR em amostras micro-dissecadas de captura por laser, análise de transferência de western de amostras clínicas e linhas celulares, e análise de "array" de tecidos. Protocolos típicos para avaliar o estado de

expressão do gene PHOR-1 e produtos de genes podem ser observados, por exemplo em *Current Protocols In Molecular Biology*, Unidades 2 [Transferência de northern], 4 [Transferência de Southern], 15 [Imunotransferência] e 18 [Análise de PCR], Frederick M. Ausubul et al. eds., 1995.

Num aspecto, a invenção proporciona métodos para monitorização dos produtos genéticos de PHOR-1 através da determinação do estado dos produtos genéticos de PHOR-1 expressados por células numa amostra de tecido de teste de um indivíduo suspeito de possuir uma doença associada a crescimento celular desregulado (tais como hiperplasia ou cancro) e depois comparando o estado assim determinado com o estado dos produtos genéticos de PHOR-1 numa amostra normal correspondente, a presença de produtos genéticos aberrantes de PHOR-1 na amostra de teste relativa à amostra normal proporcionando uma indicação da presença de crescimento celular desregulado nas células do indivíduo.

Noutro aspecto, a invenção proporciona ensaios úteis na determinação da presença de cancro num indivíduo, compreendendo detectar um aumento significativo na expressão de mRNA ou proteína de PHOR-1 numa célula de teste ou amostra de tecido relativa aos níveis de expressão na célula ou tecido normal correspondente. A presença de mRNA de PHOR-1 pode, por exemplo, ser avaliada em amostras de tecido incluindo, mas não limitado a cólon, pulmão, próstata, pâncreas, bexiga, mama, ovário, cervical, testículo, cabeça e pescoço, cérebro, estômago, osso, etc. A presença

de expressão significativa de PHOR-1 em qualquer um destes tecidos pode ser útil para indicar a emergência, presença e/ou gravidade destes cancros ou uma metástase de cancro originando noutro tecido, uma vez que os tecidos normais correspondentes não expressam mRNA de PHOR-1 ou expressam-no a níveis inferiores.

Numa forma de realização relacionada, o estado da expressão de PHOR-1 pode ser determinado ao nível da proteína em vez de ao nível do ácido nucleico. Por exemplo, um tal método ou ensaio iria compreender determinar o nível de proteína PHOR-1 expressada por células numa amostra de tecido de teste e comparando o nível assim determinado com o nível de PHOR-1 expressado numa amostra normal correspondente. Numa forma de realização, a presença de proteína PHOR-1 é avaliada, por exemplo, utilizando métodos imuno-histoquímicos. Os anticorpos contra PHOR-1 ou parceiros de ligação capazes de detectar a expressão da proteína PHOR-1 podem ser utilizados numa variedade de formatos de ensaio bem conhecidos na técnica para este objectivo.

Noutras formas de realização relacionadas, pode avaliar-se a integridade de sequências de nucleótido e de aminoácidos de PHOR-1 numa amostra biológica de modo a identificar perturbações na estrutura destas moléculas, tais como inserções, deleções, substituições e semelhantes. Essas formas de realização são úteis porque são observadas perturbações nas sequências de nucleótidos e de aminoácidos num grande número de proteínas associadas com um fenótipo

de crescimento desregulado (ver e.g. Marrogi *et al.*, *J. Cutan. Pathol.* 26(8): 369-378 (1999)). Neste contexto, uma vasta variedade de ensaios para observar perturbações nas sequências de nucleótidos e de aminoácidos são bem conhecidas na técnica. Por exemplo, o tamanho e estrutura de sequências de ácidos nucleicos ou de aminoácidos de produtos do gene PHOR-1 podem ser observados através dos protocolos de northern, Southern, western, PCR e sequenciação de DNA aqui discutidos. Adicionalmente, são bem conhecidos na técnica outros métodos para observar perturbações nas sequências de nucleótidos e de aminoácidos, tais como a análise de polimorfismo de conformação de cadeia simples (ver e.g. Patente U.S. Nos. 5 382 510 e 5 952 170).

Noutra forma de realização, pode ser examinado o estado de metilação do gene PHOR-1 numa amostra biológica. Ocorre frequentemente desmetilação aberrante e/ou hipermetilação de ilhas de CpG nas regiões reguladoras 5' do gene, em células imortalizadas e transformadas e pode resultar na expressão alterada de vários genes. Por exemplo, a hipermetilação do promotor da classe pi da glutathione S-transferase (uma proteína expressada na próstata normal mas não expressada em >90% dos carcinomas da próstata) parece silenciar permanentemente a transcrição deste gene e é a alteração genómica mais frequentemente detectada em carcinomas da próstata (De Marzo *et al.*, *Am. J. Pathol.* 155(6): 1985-1992 (1999)). Adicionalmente, esta alteração está presente em pelo menos 70% dos casos de neoplasia intraepitelial prostática de grau elevado (PIN)

(Brooks *et al*, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 1998, 7:531-536).

Noutro exemplo, a expressão do gene específico de tumor LAGE-I (que não é expressado na próstata normal, mas é expressado em 25-50% dos cancros da próstata) é induzida por desoxi-azacitidina em células linfoblastóides, sugerindo que a expressão tumoral seja devida a desmetilação (Lethe *et al.*, 1998, *Int. J. Cancer* 76(6): 903-908). Neste contexto, são bem conhecidos na técnica uma variedade de ensaios para examinar o estado de metilação de um gene. Por exemplo, pode utilizar-se em abordagens de hibridação de Southern enzimas de restrição sensíveis à metilação que não podem clivar sequências que contêm sítios de CpG metilados de modo a avaliar o estado global de metilação das ilhas de CpG.

Adicionalmente, MSP (PCR específico para metilação) pode rapidamente determinar o perfil do estado de metilação de todos os sítios CpG presentes numa ilha CpG de um dado gene. Este processo envolve a modificação inicial de DNA por bissulfito de sódio (que irá converter todas as citosinas não metiladas em uracilo) seguido por amplificação utilizando iniciadores específicos para DNA metilado versus não metilado. Protocolos envolvendo interferência de metilação podem também ser encontrados por exemplo em *Current Protocols In Molecular Biology*, Unidade 12, Frederick M. Ausubel *et al.* eds., 1995.

Noutra forma de realização relacionada, a invenção proporciona ensaios úteis na determinação da presença de cancro num indivíduo, compreendendo detectar uma alteração significativa nas variantes de excisão alternativa de PHOR-1 expressadas numa célula de teste ou amostra de tecido relativa aos níveis de expressão na célula ou tecido normal correspondente. A monitorização de variantes de excisão alternativa de PHOR-1 é útil porque as alterações na excisão alternativa de proteínas é sugerida como um dos passos numa série de eventos que conduzem à progressão de cancros (ver *e.g.* Carstens *et al.*, *Oncogene* 15(250: 3059-3065 (1997))).

A amplificação de genes proporciona um método adicional de avaliação do estado de PHOR-1. A amplificação do gene pode ser medida numa amostra directamente, por exemplo, através de transferência de Southern convencional, transferência de northern para quantificar a transcrição de mRNA [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 (1980)], transferência por gota (análise de DNA), ou hibridação *in situ*, utilizando uma sonda marcada apropriadamente, com base nas sequências aqui proporcionadas. Alternativamente, podem ser empregues anticorpos que podem reconhecer duplexes específicos, incluindo duplexes de DNA, duplexes de RNA, e duplexes híbridos DNA-RNA ou duplexes DNA-proteína. Os anticorpos, por sua vez, podem ser marcados e o ensaio pode ser realizado quando o duplex se liga a uma superfície, de modo a que após a formação do duplex na superfície, a presença do anticorpo ligado ao duplex pode ser detectada.

Adicionalmente aos tecidos discutidos acima, o sangue periférico pode ser convenientemente avaliado quanto à presença de células de cancro incluindo, mas não limitado a cancros da próstata, utilizando RT-PCR para detectar a expressão de PHOR-1. A presença de mRNA de PHOR-1 amplificável por RT-PCR proporciona uma indicação da presença do cancro. Ensaaios de detecção por RT-PCR para células tumorais em sangue periférico estão presentemente a ser avaliados para utilização no diagnóstico e gestão de um número de tumores sólidos humanos. No campo do cancro da próstata, estes incluem ensaios de RT-PCR para a detecção de células que expressam PSA e PSM (Verkaik *et al.*, 1997, *Urol. Res.* 25: 373-384; Ghossein *et al.*, 1995, *J. Clin. Oncol.* 13: 1195-2000; Heston *et al.*, 1995, *Clin. Chem.* 41: 1687-1688). Os ensaios de RT-PCR são bem conhecidas na técnica.

Um aspecto relacionado da invenção está dirigido à previsão da susceptibilidade para desenvolver cancro num indivíduo. Numa forma de realização, um método para prever a susceptibilidade para o cancro compreende detectar mRNA de PHOR-1 ou proteína PHOR-1 numa amostra de tecido, indicando a sua presença susceptibilidade para o cancro, em que o grau de expressão de mRNA PHOR-1 presente é proporcional ao grau de susceptibilidade. Numa forma de realização específica, a presença de PHOR-1 em tecido da próstata é examinada, com a presença de PHOR-1 na amostra proporcionando uma indicação de susceptibilidade a cancro

da próstata (ou à emergência ou existência de um tumor na próstata). Numa forma de realização intimamente relacionada, pode ser avaliada a integridade de sequências de nucleótidos e de aminoácidos de PHOR-1 numa amostra biológica de modo a identificar perturbações na estrutura destas moléculas tais como inserções, deleções, substituições e semelhantes, com a presença de uma ou mais perturbações nos produtos do gene PHOR-1 na amostra proporcionando uma indicação de susceptibilidade ao cancro (ou à emergência ou existência de um tumor).

Ainda outro aspecto relacionado da invenção é dirigido a métodos para graduar a agressividade do tumor. Numa forma de realização, um método para graduar a agressividade de um tumor compreende determinar o nível de mRNA de PHOR-1 ou proteína PHOR-1 expressada pelas células numa amostra do tumor, comparando o nível assim determinado com o nível de mRNA de PHOR-1 ou proteína PHOR-1 expressados num tecido normal correspondente retirado do mesmo indivíduo ou uma amostra de referência de tecido normal, em que o grau de mRNA de PHOR-1 ou expressão de proteína PHOR-1 na amostra tumoral relativa à amostra normal indica o grau de agressividade. Numa forma de realização específica, a agressividade dos tumores da próstata é avaliada determinando a extensão à qual o PHOR-1 é expressado nas células tumorais, com níveis de expressão mais elevados indicando tumores mais agressivos. Numa forma de realização intimamente relacionada, pode ser avaliada a integridade das sequências de nucleótidos e de aminoácidos de PHOR-1 numa amostra biológica de modo a identificar

perturbações na estrutura destas moléculas tais como inserções, deleções, substituições e semelhantes, com a presença de uma ou mais perturbações indicando tumores mais agressivos.

Ainda outro aspecto relacionado da invenção está dirigido a métodos para observar a progressão de uma malignidade num indivíduo ao longo do tempo. Numa forma de realização, métodos para observar a progressão de uma malignidade num indivíduo ao longo do tempo compreende determinar o nível de mRNA de PHOR-1 ou proteína PHOR-1 expressado pelas células numa amostra de tumor, em comparação com o nível assim determinado para o nível de mRNA de PHOR-1 ou proteína PHOR-1 expressados numa amostra de tecido equivalente retirada do mesmo indivíduo a um tempo diferente, em que o grau de expressão de mRNA de PHOR-1 ou proteína PHOR-1 na amostra tumor ao longo do tempo proporciona informação sobre a progressão do cancro. Numa forma de realização específica, a progressão de um cancro é avaliada determinando a extensão até à qual a expressão de PHOR-1 nas células tumorais se altera ao longo do tempo, com níveis de expressão mais elevados indicando uma progressão do cancro. Numa forma de realização intimamente relacionada, pode avaliar-se a integridade de sequências de nucleótidos e de aminoácidos de PHOR-1 numa amostra biológica de modo a identificar perturbações na estrutura destas moléculas tais como inserções, deleções, substituições e semelhantes, com a presença de uma ou mais perturbações indicando a progressão do cancro.

As abordagens de diagnóstico acima podem ser combinadas com qualquer uma de uma vasta variedade de protocolos de prognóstico e diagnóstico conhecidos na técnica. Por exemplo, outra forma de realização da invenção aqui revelada está dirigida a métodos para observar uma coincidência entre a expressão de gene PHOR-1 e de produtos do gene PHOR-1 (ou perturbações no gene PHOR-1 e produtos do gene PHOR-1) e um factor que está associado com a malignidade como um meio para diagnosticar e prognosticar o estado de uma amostra de tecido. Neste contexto, uma vasta variedade de factores associados com a malignidade podem ser utilizados, tais como a expressão de genes de outra forma associados com a malignidade (incluindo expressão de PSA, PSCA e PSM) assim como observações citológicas grosseiras (ver e.g. Bocking et al., 1984, *Anal. Quant. Cytol.* 6(2):74-88; Eptsein, 1995, *Hum. Pathol.* 1995 Feb;26(2):223-9; Thorson et al., 1998, *Mod. Pathol.* 11(6):543-51; Baisden et al., 1999, *Am. J. Surg. Pathol.* 23(8):918-24). Métodos para observar uma coincidência entre a expressão do gene PHOR-1 e PHOR-1 gene produtos (ou perturbações in PHOR-1 gene e produtos do gene PHOR-1) e um factor adicional que está associado à malignidade são úteis, por exemplo, devido à presença de um conjunto ou constelação de factores específicos que coincidem, proporciona informação crucial para diagnosticar e prognosticar o estado de uma amostra de tecido.

Numa forma de realização típica, os métodos para observar uma coincidência entre a expressão do gene PHOR-1

e produtos do gene PHOR-1 (ou perturbações no gene PHOR-1 e produtos do gene PHOR-1) e um factor que está associado a malignidade confere detecção da sobre-expressão de mRNA de PHOR-1 ou proteína numa amostra de tecido, detectado a sobre-expressão de mRNA de PSA ou proteína numa amostra de tecido, e observando uma coincidência de mRNA de PHOR-1 ou proteína e mRNA de PSA ou sobre-expressão de proteína. Numa forma de realização específica, a expressão de mRNA de PHOR-1 e PSA em tecido da próstata é examinada. Numa forma de realização preferida, a coincidência da sobre-expressão de mRNA de PHOR-1 e PSA na amostra proporciona uma indicação de cancro da próstata, susceptibilidade a cancro da próstata ou a emergência ou existência de um tumor na próstata.

Métodos para detectar e quantificar a expressão de mRNA ou proteína PHOR-1 são aqui descritos e utilizam tecnologias de detecção e quantificação de ácido nucleico e proteína convencionais bem conhecidas na técnica. Métodos convencionais para a detecção e quantificação de mRNA de PHOR-1 incluem hibridação *in situ* utilizando ribo-sondas de PHOR-1 marcadas, transferência de northern e técnicas relacionadas utilizando sondas de polinucleótido de PHOR-1, análise de RT-PCR utilizando iniciadores específicos para PHOR-1, e outros métodos de detecção do tipo amplificação, tais como, por exemplo, DNA ramificado, SISBA, TMA e semelhantes. Numa forma de realização específica, pode ser utilizada RT-PCR semi-quantitativa para detectar e quantificar a expressão de mRNA de PHOR-1 como descrito nos

Exemplos que se seguem. Qualquer número de iniciadores capazes de amplificar PHOR-1 podem ser utilizados para este objectivo, incluindo mas não estando limitado aos vários conjuntos de iniciadores especificamente aqui descritos. Métodos convencionais para a detecção e quantificação de proteína podem ser utilizados para este objectivo. Numa forma de realização específica, anticorpos policlonais ou monoclonais especificamente reactivos com a proteína PHOR-1 de tipo selvagem podem ser utilizados num ensaio de imunohistoquímica de tecido sujeito a biópsia.

IDENTIFICAR MOLÉCULAS QUE INTERAGEM COM PHOR-1

As sequências de proteína PHOR-1 aqui reveladas permitem que o especialista na técnica possa identificar proteínas, pequenas moléculas e outros agentes que interagem com PHOR-1 e vias activadas por PHOR-1 através de qualquer um de uma variedade de protocolos aceites na técnica. Por exemplo, pode utilizar-se apenas um de uma variedade de sistemas denominados de captura de interacção (também referidos como o "ensaio de dois híbridos"). Nesses sistemas, moléculas que interagem reconstituem um factor de transcrição e expressão directa de um gene repórter, cuja expressão é então ensaiada. Sistemas típicos identificam interacções proteína-proteína *in vivo* através da reconstituição de um activador de transcrição eucariótico e são revelados por exemplo na Patente U.S. Nos. 5 955 280, 5 925 523, 5 846 722 e 6 004 746.

Alternativamente, podem identificar-se moléculas que interagem com sequências de proteína PHOR-1 através de do rastreio de bibliotecas de péptidos. Nesses métodos, os péptidos que se ligam a moléculas de receptor seleccionadas, tais como PHOR-1, são identificados através do rastreio de bibliotecas que codificam uma colecção de aminoácidos aleatória ou controlada. Péptidos codificados pelas bibliotecas são expressados como proteínas de fusão de proteínas de revestimento de bacteriófagos, e as partículas de bacteriófago são então rastreadas contra os receptores de interesse. Péptidos possuindo uma vasta variedade de utilizações, tais como reagentes terapêuticos ou de diagnóstico, podem assim ser identificados sem qualquer informação anterior sobre a estrutura da molécula de ligando ou receptor esperada. Bibliotecas de péptidos e métodos de rastreio típicos que podem ser utilizados para identificar moléculas que interagem com sequências de proteína PHOR-1 são reveladas por exemplo nas Patentes U.S. Nos. 5 723 286 e 5 733 731. Ensaio exemplificativo para identificar moléculas que interactivam com, ou alteram, a função de uma GPCR são descritos em Moon *et al.*, 1999, *PNAS* 96(25):14605-14610; Breer *et al.*, 1998, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 855:175-181; e Sinnett-Smith *et al.*, 2000, *J. Biol. Chem.* 275(39):30644-30652.

Alternativamente, as linhas celulares que expressam PHOR-1 podem ser utilizadas para identificar as interacções proteína-proteína mediadas por PHOR-1. Esta possibilidade pode ser examinada utilizando técnicas de

imunoprecipitação como apresentado por outros (Hamilton BJ, *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, 261:646-51). Tipicamente, a proteína PHOR-1 pode ser imunoprecipitada a partir de linhas celulares de cancro da próstata expressando PHOR-1, utilizando anticorpos anti-PHOR-1. Alternativamente, podem ser utilizados anticorpos contra His-tag numa linha celular modificada para expressar PHOR-1 (vectores mencionados acima). O complexo imunoprecipitado pode ser examinado para associação de proteína através de processos tais como transferência de western, marcação de proteínas com 35S-metionina, micro-sequenciação de proteínas, coloração com prata e electroforese em gel bidimensional.

Moléculas pequenas que interactuam com PHOR-1 podem ser identificadas através de formas de realização relacionadas desses ensaios de rastreio. Por exemplo, podem ser identificadas pequenas moléculas que interferem com a função de GPCR, incluindo moléculas que interferem com a capacidade de PHOR-1 para mediar a fosforilação e desfosforilação, sinalização de mensageiros secundários e tumorigénese. Métodos típicos são discutidos, por exemplo na Patente U.S. No. 5 928 868 e incluem métodos para formar ligandos híbridos nos quais pelo menos um ligando é uma molécula pequena. Numa forma de realização ilustrativa, o ligando híbrido é introduzido nas células que, por sua vez, contêm um primeiro e um segundo vector de expressão. Cada vector de expressão inclui DNA para expressar uma proteína híbrida que codifica uma proteína alvo ligada a uma

sequência codificante para um módulo de transcrição. As células contêm ainda um gene repórter, cuja expressão é condicionada pela proximidade da primeira e segunda proteínas híbridas uma em relação à outra, um evento que ocorre apenas se o ligando híbrido se liga aos sítios alvo em ambas as proteínas híbridas. Estas células que expressam o gene repórter são seleccionadas e a molécula pequena desconhecida ou a proteína híbrida desconhecida é identificada.

Uma forma de realização típica desta invenção consiste num método de rastreio para uma molécula que interage com uma sequência de aminoácidos de PHOR-1 apresentada na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2), compreendendo os passos de contactar uma população de moléculas com a sequência de aminoácido de PHOR-1, permitindo que a população de moléculas e a sequência de aminoácidos de PHOR-1 para interagir nas condições que facilitam uma interacção, determinando a presença de uma molécula que interage com a sequência de aminoácidos de PHOR-1 e depois separar as moléculas que não interagem com a sequência de aminoácidos de PHOR-1 das moléculas que interagem com a sequência de aminoácido de PHOR-1. Numa forma de realização específica, o método inclui ainda purificar uma molécula que interage com a sequência de aminoácidos de PHOR-1. Numa forma de realização preferida, a sequência de aminoácidos de PHOR-1 é colocada em contacto com uma biblioteca de péptidos.

MÉTODOS E COMPOSIÇÕES TERAPÊUTICOS

A identificação de PHOR-1 como uma proteína do cancro da próstata, abre várias abordagens terapêuticas para o tratamento de cancros da próstata. Como discutido acima, PHOR-1 é um receptor acoplado a proteína G (GPCR), e a sua expressão induz crescimento de colónia e modula cAMP e fosforilação da tirosina. Adicionalmente, PHOR-1 apresenta epitopos na superfície celular que podem ser direccionados para terapia.

O perfil de expressão de PHOR-1 é remanescente de MAGEs, PSA e PMSA, que são genes específicos para o tecido que são regulados positivamente em melanomas e outros cancros (Van den Eynde e Boon, *Int J Clin Lab Res.* 27:81-86, 1997). Devido à sua expressão específica para o tecido e níveis de expressão elevados no cancro, estas moléculas estão presentemente a ser investigadas como alvos para vacinas do cancro (Durrant, *Anticancer Drugs* 8:727-733, 1997; Reynolds et al., *Int J Cancer* 72:972-976, 1997). O padrão de expressão de PHOR-1 proporciona evidência que é igualmente um alvo ideal para uma abordagem de vacina de cancro para o cancro da próstata, na medida em que a sua expressão não é detectada na maioria dos tecidos normais. As suas características estruturais como uma GPCR também proporcionam evidência de que PHOR-1 pode ser uma molécula pequena alvo, assim como alvo para estratégias terapêuticas baseadas em anticorpo. A estratégia terapêutica pode ser concebida para inibir a função de GPCR da molécula ou para direccionar a própria molécula de PHOR-1.

Consequentemente, espera-se que as abordagens terapêuticas direccionadas para porções extracelulares de PHOR-1, ou direccionadas para a inibição da actividade da proteína PHOR-1, sejam úteis para doentes que sofrem de cancro da próstata e outros cancros que expressam PHOR-1. As abordagens terapêuticas dirigidas para a inibição da actividade da proteína PHOR-1 geralmente caem em duas classes. Uma classe compreende vários métodos para inibir a ligação ou associação da proteína PHOR-1 com o seu parceiro de ligação ou com outras proteínas. Outra classe compreende uma variedade de métodos para inibir a transcrição do gene PHOR-1 ou tradução de mRNA de PHOR-1.

PHOR-1 como um Alvo de Superfície Celular para Terapia à Base de Anticorpo

A expressão de PHOR-1 na superfície celular indica que esta molécula é um alvo atractivo para estratégias de terapêutica à base de anticorpo. Dado que PHOR-1 é expressado em células de cancro e não na maioria das células normais, seria de esperar que a administração sistémica de composições imunorreactivas de PHOR-1 exhibisse excelente sensibilidade sem efeitos tóxicos, não específicos e/ou não alvo provocados pela ligação da molécula imunoterapêutica aos órgãos e tecidos não alvo. Os anticorpos especificamente reactivos com domínios extracelulares de PHOR-1 podem ser úteis para tratar cancros que expressam PHOR-1 sistemicamente, quer como conjugados com

uma toxina ou agente terapêutico, ou como anticorpos nus capazes de inibir a proliferação ou função celular.

Os anticorpos contra PHOR-1 podem ser introduzidos num doente de modo a que o anticorpo se ligue a PHOR-1 nas células de cancro e medeie a destruição das células e o tumor e/ou iniba o crescimento das células ou do tumor. Mecanismos através dos quais esses anticorpos exercem um efeito terapêutico podem incluir citólise mediada põe complemento, citotoxicidade celular dependente de anticorpo, modular a função fisiológica de PHOR-1, inibir a ligação do ligando ou vias de transdução de sinal, modular a diferenciação de células tumorais, alterar perfis de factor de angiogénese tumoral, e/ou através da indução de apoptose. Os anticorpos contra PHOR-1 podem ser conjugados com agentes tóxicos ou terapêuticos e utilizados para distribuir o agente tóxico ou terapêutico directamente a células tumorais contendo PHOR-1. Exemplos de agentes tóxicos incluem, mas não estão limitados a, calquemicina, maitansinóides, radioisótopos tais como ¹³¹I, ítrio, e bismuto.

Imunoterapia do cancro utilizando anticorpos anti-PHOR-1 podem seguir os ensinamentos criados a partir de várias abordagens que foram bem sucedidas empregues no tratamento de outros tipos de cancro, incluindo, mas não limitadas a cancro do cólon (Arlen *et al.*, 1998, *Crit. Rev. Immunol.* 18:133-138), mieloma múltiplo (Ozaki *et al.*, 1997, *Blood* 90: 3179-3186; Tsunenari *et al.*, 1997, *Blood* 90:2437-

2444), cancro gástrico (Kasprzyk et al., 1992, *Cancer Res.* 52: 2771-2776), linfoma de células B (Funakoshi et al., 1996, *J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol.* 19:93-101), leucemia (Zhong et al., 1996, *Leuk. Res.* 20:581-589), cancro colorrectal (Moun et al., 1994, *Cancer Res.* 54:6160-6166); Velders et al., 1995, *Cancer Res.* 55:4398-4403), e cancro da mama (Shepard et al., 1991, *J. Clin. Immunol.* 11:117-127). Algumas abordagens terapêuticas envolvem a conjugação de anticorpo nu com uma toxina, tal como a conjugação de ¹³¹I com anticorpos anti-CD20 (e.g., Bexxar, Coulter Pharmaceutical), enquanto que outros envolvem a coadministração de anticorpos e outros agentes terapêuticos, tais como HerceptinTM (trastuzumab) com paclitaxel (Genentech, Inc.). Para o tratamento de cancro da próstata, por exemplo, podem ser administrados anticorpos contra PHOR-1 em conjugação com radiação, quimioterapia ou remoção de hormona.

Embora a terapia de anticorpo contra PHOR-1 possa ser útil para todos os estádios de cancro, a terapia de anticorpo pode ser particularmente apropriada em cancros avançados ou metastáticos. O tratamento com a terapia de anticorpo da invenção pode ser indicado para doentes que não tenham recebido previamente uma ou mais quimioterapias, enquanto que a combinação da terapia de anticorpo da invenção com um regime quimioterapêutico ou de radiação pode ser preferido para doentes que não tenham recebido tratamento quimioterapêutico. Adicionalmente, a terapia de anticorpo pode permitir a utilização de dosagens reduzidas

de quimioterapia concomitante, particularmente para doentes que não toleram muito bem a toxicidade do agente quimioterapêutico.

Pode ser desejável para alguns doentes de cancro serem avaliados quanto à presença e nível de expressão de PHOR-1, preferencialmente utilizando avaliações imuno-histoquímicas de tecido tumoral, sistemas de imagem quantitativos, ou outras técnicas capazes de indicar com fiabilidade a presença e grau de expressão de PHOR-1. Análise imuno-histoquímica de biópsias tumorais ou espécimes cirúrgicos podem ser preferidos para este objectivo. Os métodos para análise imuno-histoquímica de tecidos tumorais são bem conhecidos na técnica.

Os anticorpos monoclonais anti-PHOR-1 úteis no tratamento do cancro da próstata e outros cancros incluem aqueles que são capazes de iniciar uma resposta imunitária potente contra o tumor e aqueles que são capazes de dirigir citotoxicidade. A este respeito, os anticorpos monoclonais anti-PHOR-1 (mAbs) podem induzir a lise de célula tumoral através de qualquer mecanismo de citotoxicidade celular quer mediada por complemento ou dependente de anticorpo (ADCC), em que ambos podem requerer uma porção de Fc intacta da molécula de imunoglobulina para interacção com sítios receptores de Fc de célula efectora ou proteínas de complemento. Adicionalmente, mAbs anti-PHOR-1 que exercem um efeito biológico directo no crescimento tumoral são úteis na prática da invenção. Os mecanismos potenciais

através dos quais esses mAbs directamente citotóxicos podem actuar incluem a inibição do crescimento celular, modulação de diferenciação celular, modulação dos perfis de factor de angiogénese tumoral, e a indução de apoptose. O mecanismo pelo qual um mAb anti-PHOR-1 particular exerce um efeito anti-tumoral pode ser avaliado utilizando qualquer número de ensaios *in vitro* concebidos para determinar ADCC, ADMMC, lise celular mediada pró complemento, e assim por diante, como é geralmente conhecido na técnica.

A utilização de anticorpos de murino ou outros anticorpos monoclonais não humanos, ou mAbs quiméricos humanos/de ratinho podem induzir respostas imunitárias moderadas a fortes em alguns doentes. Em alguns casos, isto irá resultar na eliminação do anticorpo da circulação e eficácia reduzida. Na maioria dos casos graves, essa resposta imunitária pode conduzir à formação extensiva de complexos imunitários que, potencialmente, podem provocar falência renal. Consequentemente, anticorpos monoclonais preferidos utilizados na prática dos métodos terapêuticos da invenção são aqueles que são totalmente humanos ou humanizados e se ligam especificamente ao antigénio de PHOR-1 alvo com elevada afinidade mas apresentam antigenicidade baixa ou nenhuma no doente.

Métodos terapêuticos da invenção contemplam a administração de mAbs anti-PHOR-1 únicos, bem como combinações, ou cocktails, de diferentes mAbs. Esses cocktails de mAbs podem possuir certas vantagens na medida em que

contêm mAbs que têm como alvo diferentes epitopos, explorando diferentes mecanismos efectores ou mAbs citotóxicos directamente combinados com mAbs que se baseiam na funcionalidade efectora imunitária. Esses mAbs em combinação podem apresentar efeitos terapêuticos sinérgicos. Adicionalmente, a administração de mAbs anti-PHOR-1 pode ser combinada com outros agentes terapêuticos incluindo, mas não estando limitado a vários agentes quimioterapêuticos, bloqueadores de androgénio, e moduladores imunitários (e.g., IL-2, GM-CSF). Os mAbs anti-PHOR-1 podem ser administrados na sua forma "nua" ou não conjugada, ou podem possuir agentes terapêuticos conjugados com estes.

As formulações de anticorpo anti-PHOR-1 podem ser administradas através de qualquer via capaz de distribuir os anticorpos ao sítio tumoral. Vias de administração potencialmente eficazes incluem, mas não estão limitados a, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intratumoral, intradérmica, e semelhantes. O tratamento irá geralmente envolver a administração repetida da preparação do anticorpo anti-PHOR-1 através de uma via de administração aceitável, tal como injeção intravenosa (IV), tipicamente a uma dose no intervalo de cerca de 0,1 até cerca de 10 mg/kg de peso corporal. Doses no intervalo de 10-500 mg de mAb por semana podem ser eficazes e bem toleradas.

Com base na experiência clínica com o mAb Herceptin no tratamento de cancro da mama metastático, uma dose de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg de peso

corporal do doente IV seguida por doses semanais de cerca de 2 mg/kg IV da preparação de mAb anti-PHOR-1 pode representar um regime de dosagem aceitável. Preferencialmente, a dose de carga inicial é administrada como uma infusão de 90 minutos ou mais prolongada. A dose de manutenção periódica pode ser administrada como uma infusão de 30 minutos ou mais prolongada, desde que a dose inicial seja bem tolerada. Todavia, como um especialista na técnica entenderá, vários factores irão influenciar o regime de dose ideal num caso particular. Esses factores podem incluir, por exemplo, a afinidade de ligação e a semi-vida de Ab ou mAbs utilizados, o grau de expressão de PHOR-1 no doente, a extensão da circulação de antigénio de PHOR-1 protegido, o nível de concentração do anticorpo de estado estacionário desejado, frequência de tratamento, e a influência de agentes quimioterapêuticos utilizados em combinação com o método de tratamento da invenção.

Optimamente, os doentes devem ser avaliados para o nível de circulação de antigénio de PHOR-1 protegido no soro de modo a assistir na determinação do regime de dosagem mais eficaz e factores relacionados. Essas avaliações também podem ser utilizadas para objectivos de monitorização ao longo da terapia, e pode ser útil determinar o grau do sucesso terapêutico em combinação com a avaliação de outros parâmetros (tais como os níveis de PSA no soro em terapia de cancro da próstata).

Inibição da Função da Proteína PHOR-1

A invenção inclui vários métodos e composições para inibir a ligação de PHOR-1 ao seu parceiro de ligação ou ligando, ou a sua associação com outra(s) proteína(s) bem como métodos para inibir a função de PHOR-1. As moléculas que têm como alvo o terminal N de PHOR-1, tais como o anticorpo descrito nos exemplos que se seguem, são particularmente atractivos para inibir a função da proteína porque eles são provavelmente dirigidos ao alvo de um ligando-sítio de ligação em PHOR-1.

Inibição de PHOR- 1 com Proteínas Recombinantes

Numa abordagem, as moléculas recombinantes que são capazes de inibir PHOR-1 prevenindo assim PHOR-1 do acesso/ligação ao seu parceiro(s) de ligação ou associação com outras proteína(s) são utilizados para inibir a função de PHOR-1. Essas moléculas recombinantes podem, por exemplo, conter a(s) parte(s) reactiva(s) de uma molécula de anticorpo específico para PHOR-1. Numa forma de realização particular, o domínio de ligação a PHOR-1 de um parceiro de ligação a PHOR-1 pode ser modificado para uma proteína de fusão dimérica compreendendo dois domínios de ligação ao ligando de PHOR-1 ligados à porção Fc de uma IgG humana, tais como IgG1 humano. Essa porção de IgG pode conter, por exemplo, os domínios CH2 e CH3 e a região da dobra, mas não o domínio CH1. Essas proteínas de fusão diméricas podem ser administradas na forma solúvel a

doentes que sofrem de um cancro associado com a expressão de PHOR-1, incluindo mas não limitado a cancros da próstata, mama, bexiga, pulmão, osso, cólon, pancreático, testicular, cervical e ovárico, em que a proteína de fusão dimérica se liga especificamente a PHOR-1 bloqueando desse modo a interacção de PHOR-1 com um parceiro de ligação. Essas proteínas de fusão diméricas podem ser ainda combinadas em proteínas multiméricas utilizando tecnologias conhecidas de ligação ao anticorpo.

Inibição de PHOR-1 com Anticorpos Intracelulares

Noutra abordagem, os vectores recombinantes codificando anticorpos de cadeia simples que se ligam especificamente a PHOR-1 podem ser introduzidos em células que expressam PHOR-1 através de tecnologias de transferência de genes, em que o anticorpo anti-PHOR-1 de cadeia simples codificado é expressado intracelularmente, liga-se à proteína PHOR-1, e por isso inibe a sua função. Métodos para modificar esses anticorpos de cadeia simples intracelular são bem conhecidos. Esses anticorpos intracelulares, também conhecidos como "intracorpos", podem ser especificamente direccionados para um compartimento particular na célula, proporcionando controlo sobre onde a actividade inibidora do tratamento se focará. Esta tecnologia foi bem sucedida aplicada na técnica (para revisão, ver Richardson e Marasco, 1995, *TIBTECH* vol. 13). Os intracorpos demonstraram eliminar virtualmente a expressão de receptores de superfície celular de outra forma

abundantes. Ver, por exemplo, Richardson et al., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3137-3141; Beerli et al., 1994, *J. Biol. Chem.* 289: 23931-23936; Deshane et al., 1994, *Gene Ther.* 1: 332-337.

Anticorpos compreendem os domínios variáveis da cadeia pesada e leve unida por um polipéptido de ligante flexível, e são expressados como um polipéptido único. Opcionalmente, os anticorpos de cadeia simples podem ser expressados como um fragmento de região variável de cadeia simples unido à região constante de cadeia leve. Sinais de tráfego intracelular bem conhecidos podem ser modificados nos vectores de polinucleótido recombinante codificando esses anticorpos de cadeia simples de modo a direccionar com precisão o intracorpo expressado para o compartimento intracelular desejado. Por exemplo, intracorpos dirigidos para o retículo endoplásmico (ER) podem ser modificados para incorporar um péptido líder e, opcionalmente, um sinal de retenção de ER C-terminal, tal como o motivo de aminoácidos KDEL. Intracorpos pretendidos para exercer actividade no núcleo podem ser modificados para incluir um sinal de localização nuclear. As unidades lipídicas podem ser ligadas aos intracorpos de modo a fixar o intracorpo no lado citossólico da membrana plasmática. Os intracorpos podem também ser direccionados para exercer função no citossol. Por exemplo, os intracorpos citossólicos podem ser utilizados para sequestrar factores no citossol, prevenindo desse modo que sejam transportados para o seu destino celular natural.

Numa forma de realização, os intracorporos de PHOR-1 são concebidos para se ligarem especificamente a um domínio de PHOR-1 particular. Por exemplo, intracorporos citossólicos que se ligam especificamente à proteína PHOR-1 podem ser utilizados para prevenir que moléculas relacionadas com PHOR-1 ganhem acesso ao núcleo, prevenindo-o assim de exercer qualquer actividade biológica no núcleo.

De modo a dirigir a expressão desses intracorporos especificamente para células tumorais particulares, a transcrição do intracorporo pode ser colocada sob o controlo regulador de um promotor e/ou intensificador apropriado específico para o tumor. De modo a direccionar a expressão do intracorporo especificamente para a próstata, por exemplo, o promotor de PSA e/ou promotor/intensificador pode ser utilizado (Ver, por exemplo, Patente U.S. No. 5 919 652).

Inibição de Transcrição ou Tradução de PHOR-1

Noutra classe de abordagens terapêuticas, a invenção proporciona vários métodos e composições para inibir a transcrição do gene PHOR-1. De um modo semelhante, a invenção também proporciona métodos e composições para inibir a tradução de mRNA de PHOR-1 numa proteína.

Numa abordagem, um método de inibição da transcrição do gene PHOR-1 compreende contactar o gene PHOR-1 com um polinucleótido anti-sentido de PHOR-1. Noutra

abordagem, um método para inibir a tradução de mRNA de PHOR-1 compreende colocar em contacto o mRNA de PHOR-1 com um polinucleótido anti-sentido. Noutra abordagem, pode ser utilizado ribozima específico para PHOR-1 pode ser utilizado para clivar a mensagem de PHOR-1, inibindo desse modo a tradução. Esses métodos baseados em ribozima e anti-sentido podem também ser dirigidos às regiões reguladoras do gene PHOR-1, tais como os elementos do promotor e/ou intensificador de PHOR-1. De um modo semelhante, as proteínas capazes de inibir um factor de transcrição do gene PHOR-1 podem ser utilizadas para inibir a transcrição de mRNA de PHOR-1. Os vários polinucleótidos e composições úteis nos métodos acima mencionados foram descritos acima. A utilização de moléculas anti-sentido e ribozima para inibir a transcrição e tradução é bem conhecida na técnica.

Outros factores que inibem a transcrição de PHOR-1 através da interferência com activação de transcrição de PHOR-1 também podem ser úteis para o tratamento de cancros que expressem PHOR-1. De um modo semelhante, factores que são capazes de interferir com o processamento de PHOR-1 podem ser úteis para o tratamento de cancros que expressem PHOR-1. Métodos de tratamento de cancro utilizando esses factores estão também dentro do âmbito da invenção.

Considerações Gerais para Estratégias Terapêuticas

A transferência de genes e as tecnologias de terapia génica podem ser utilizadas para distribuir

moléculas de polinucleótido terapêutico a células tumorais sintetizando PHOR-1 (*i.e.*, anti-sentido, ribozima, polinucleótidos codificando intracópos e outras moléculas inibidoras de PHOR-1). São conhecidas na técnica várias abordagens de terapia génica. Vectores recombinantes codificando polinucleótidos anti-sentido de PHOR-1, ribozimas, factores capazes de interferir com a transcrição de PHOR-1, e assim por diante, podem ser distribuídos a células tumorais alvo utilizando essas abordagens de terapia génica.

As abordagens terapêuticas descritas acima podem ser combinadas com qualquer um de uma vasta variedade de regimes de quimioterapia ou terapia por radiação. Estas abordagens terapêuticas podem também permitir a utilização de dosagens reduzidas de quimioterapia e/ou administração menos frequente, particularmente em doentes que não toleram bem a toxicidade do agente quimioterapêutico.

A actividade anti-tumoral de uma composição particular (*e.g.*, anti-sentido, ribozima, intracópo), ou uma combinação dessas composições, pode ser avaliada utilizando vários sistemas de ensaio *in vitro* e *in vivo*. Ensaio *in vitro* para avaliar o potencial terapêutico incluem ensaios de crescimento celular, ensaios de agar mole e outros ensaios indicativos de actividade de promoção tumoral, ensaios de ligação capazes de determinar a extensão para a qual uma composição terapêutica irá inibir a ligação de PHOR-1 a um parceiro de ligação, etc.

In vivo, o efeito de uma composição terapêutica de PHOR-1 pode ser avaliada num animal modelo adequado. Por exemplo, modelos de cancro da próstata xenogeneicos em que explantes de cancro da próstata humanos ou tecidos de xenoenxerto passados são introduzidos em animais imunocomprometidos, tais como ratinhos nus ou SCID, são apropriados em relação a cancro da próstata e foram descritos (Klein *et al.*, 1997, *Nature Medicine* 3: 402-408). Por exemplo, o Pedido de Patente PCT W098/16628, Sawyers *et al.*, publicado em 23 de Abril de 1998, descreve vários modelos de xenoenxerto de cancro da próstata humano capaz de recapitular o desenvolvimento de tumores primários, micrometástases, e a formação de metástases osteoblásticas características de doença de estágio tardio. A eficácia pode ser prevista utilizando ensaios que medem a inibição da formação de tumor, regressão de tumor ou metástase, e semelhantes. Ver, também, os Exemplos abaixo.

Ensaio *in vivo* que qualificam a promoção de apoptose podem também ser úteis na avaliação de composições terapêuticas potenciais. Numa forma de realização, os xenoenxertos de ratinhos que os comportam tratados com a composição terapêutica podem ser examinados quanto à presença de focos apoptóticos e comparados com ratinhos contendo xenoenxerto de controlo não tratados. A extensão na qual se encontram focos apoptóticos nos tumores dos ratinhos tratados proporciona uma indicação da eficácia terapêutica da composição.

As composições terapêuticas utilizadas na prática dos métodos anteriores podem ser formuladas em composições farmacêuticas compreendendo um veículo adequado para o método de distribuição desejado. Veículos adequados incluem qualquer material que quando combinado com a composição terapêutica retenha a função anti-tumoral da composição terapêutica e seja não reactiva com o sistema imunitário do doente. Exemplos incluem, mas não estão limitados a, qualquer um de vários veículos farmacêuticos convencionais, tais como soluções estéreis se soro fisiológico tamponado com fosfato, água bacteriostática, e semelhantes (ver, geralmente, Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a Edição, A. Osal., Ed., 1980).

Formulações terapêuticas que podem ser solubilizadas e administradas através de qualquer via capaz de distribuir a composição terapêutica ao sítio do tumor. Vias de administração potencialmente eficazes incluem, mas não estão limitados a, intravenosa, parentérica, intraperitoneal, intramuscular, intratumoral, intradérmica, intra-órgão, ortotópica, e semelhantes. Uma formulação preferida para injeção intravenosa compreende a composição terapêutica numa solução de água bacteriostática preservada, água não preservada estéril, e/ou diluída em sacos de polícloreto de vinilo ou polietileno contendo cloreto de sódio estéril para injeção a 0,9%, USP. As preparações de proteína terapêuticas podem ser liofilizados e armazenados como pós estéreis, preferencialmente sob vácuo, e depois reconstituídos em água bacteriostática contendo, por exem-

plo, conservante de álcool benzílico, ou em água estéril antes da injeção.

Protocolos de dosagem e administração para o tratamento de cancros utilizando os métodos anteriores variarão com o método e o cancro alvo e irão geralmente depender do número de outros factores apreciados na técnica.

VACINAS DE CANCRO

A invenção proporciona vacinas de cancro compreendendo a proteína PHOR-1 ou fragmento deste, bem como vacinas à base de DNA. À luz da expressão de PHOR-1 restringida à próstata e ao tumor, espera-se que as vacinas do cancro de PHOR-1 sejam eficazes na prevenção e/ou tratamento especificamente de cancros que expressem PHOR-1 sem criar efeitos não específicos nos tecidos não alvo. A utilização de um antigénio de tumor numa vacina para criar imunidade humoral e mediada pelas células para utilização em terapia anti-cancro é bem conhecida na técnica e foi empregue no cancro da próstata utilizando os imunogénios PSMA humano e PAP de roedores (Hodge *et al.*, 1995, *Int. J. Cancer* 63: 231-237; Fong *et al.*, 1997, *J. Immunol.* 159: 3113-3117). Esses métodos podem ser rapidamente praticados empregando uma proteína PHOR-1, ou fragmento desta, ou uma molécula de ácido nucleico codificando PHOR-1 e vectores recombinantes capazes de expressar apresentar apropriadamente o imunogénio PHOR-1.

Por exemplo, podem ser utilizados sistemas de distribuição viral para distribuir uma molécula de ácido nucleico codificando PHOR-1. Vários sistemas de distribuição de genes virais que podem ser utilizados na prática deste aspecto da invenção incluem, mas não estão limitados a, vírus vaccinia, varíola aviária, varíola dos canários adenovírus, influenza, poliovírus, adeno-associados, lentivírus, e vírus sindbus (Restifo, 1996, *Curr. Opin. Immunol.* 8: 658-663). Sistemas de distribuição não virais podem também ser empregues utilizando DNA ou codificando uma proteína PHOR-1 ou fragmento desta introduzido no doente (e.g., intramuscularmente) para induzir uma resposta antitumoral. Numa forma de realização, pode ser empregue o cDNA humano de PHOR-1 de comprimento total.

Numa forma de realização, uma vacina para o cancro de PHOR-1 baseia-se na identificação de péptidos imunogénicos na sequência de aminoácidos de PHOR-1 apresentada na FIG. 1A-D (SEQ ID NO: 2). Como ainda discutido nos exemplos abaixo, foi demonstrado que porções específicas de PHOR-1 induzem respostas de células T e B. Uma proteína de fusão GST compreendendo os aminoácidos 86-310 de PHOR-1 (FIG. 1A-D; SEQ ID NO: 2) foi utilizada para criar uma resposta imunitária em ratinhos para a produção de anticorpos monoclonais. Esta mesma proteína de fusão GST-PHOR-1, assim como dois péptidos correspondendo aos aminoácidos 1-14 (MVDPNGNESSATYF; SEQ ID NO: 8) e 262-274 (VHRFSKRSDSPLP; SEQ ID NO: 9) de PHOR-1, foram utilizados

para criar uma resposta imunitária em coelhos para a produção de anticorpos policlonais. Desse modo, estas porções específicas de PHOR-1, e polinucleótidos codificando estas porções, podem ser seleccionados para a produção de uma vacina de cancro.

Noutra forma de realização, podem ser empregues moléculas de ácido nucleico de PHOR-1 codificando epitopos específicos de linfócitos T citotóxicos (CTL). Os epitopos de CTL podem ser determinados utilizando algoritmos específicos (e.g., Epimer, Brown University) para identificar péptidos numa proteína PHOR-1 que são capazes de se ligarem optimamente a alelos de HLA especificados. Um algoritmo adequado é I algoritmo disponível no sítio da web *do* Pesquisa de Motivos de Péptido de HLA disponível na Secção de Bioinformatics and Molecular Analysis (BIMAS) (<http://bimas.dcrn.nih.gov/>). Este algoritmo baseia-se na ligação de sequências de péptido específicas no sulco de moléculas HLA de Classe I e especificamente HLA-A2 (Falk *et al.*, 1991, *Nature* 351:290-6; Hunt *et al.*, 1992, *Science* 255:1261-3; Parker *et al.*, 1992, *J. Immunol.* 149:3580-7; Parker *et al.*, 1994, *J. Immunol.* 152:163-75). O algoritmo de Pesquisa do Motivo de péptido de HLA permite a localização e classificação de péptidos 8-meros, 9-meros, e 10-meros de sequência de proteína completa para prever a ligação a HLA-A2 assim como a outras moléculas de Classe I. A maioria dos péptidos de ligação a HLA-A2 são 9-meros, contendo favoravelmente uma leucina na posição 2 e uma valina ou leucina na posição 9 (Parker *et al.*, 1992, *J.*

Immunol. 149:3580-7). A actual ligação dos péptidos a HLA-A2 pode ser avaliada por estabilização da expressão HLA-A2 na linha celular deficiente no processamento do antigénio T2 (Xue *et al.*, 1997, *Prostate* 30:73-8; Peshwa *et al.*, 1998, *Prostate* 36:129-38). A imunogenicidade de péptidos específicos pode ser avaliada *in vitro* por estimulação de CTL CD8+ na presença de células detriticas (Xue *et al.*; Peshwa *et al.*, *supra*).

Também podem ser empregues várias estratégias *ex vivo*. Uma abordagem envolve a utilização de células dendríticas para apresentar antigénio PHOR-1 ao sistema imunitário de um doente. As células dendríticas expressam MHC classe I e II, co-estimulador B7, e IL-12, e são por isso células altamente especializadas na apresentação de antigénio. No cancro da próstata, as células dendríticas autólogas pulsadas com péptidos do antigénio da membrana específico para a próstata (PSMA) estão a ser utilizadas num ensaio clínico de Fase I para estimular os sistemas imunitários de doentes com cancro da próstata (Tjoa *et al.*, 1996, *Prostate* 28: 65-69; Murphy *et al.*, 1996, *Prostate* 29: 371-380). As células dendríticas podem ser utilizadas para apresentar péptidos PHOR-1 a células T no contexto de moléculas MHC de classe I e II. Numa forma de realização, as células dendríticas autólogas são pulsadas com péptidos PHOR-1 capazes de se ligar a moléculas MHC. Noutra forma de realização, as células dendríticas são pulsadas com a proteína de PHOR-1 completa. Ainda outra forma de realização envolve modificar a sobre-expressão do gene

PHOR-1 em células dendríticas utilizando vários vectores de implementação conhecidos na técnica, tais como adenovírus (Arthur *et al.*, 1997, *Cancer Gene Ther.* 4: 17-25), retrovírus (Henderson *et al.*, 1996, *Cancer Res.* 56: 3763-3770), lentivírus, vírus adeno-associados, transfecção de DNA (Ribas *et al.*, 1997, *Cancer Res.* 57: 2865-2869), e transfecção de DNA derivado de tumor (Ashley *et al.*, 1997, *J. Exp. Med.* 186: 1177-1182). As células que expressam PHOR-1 também podem ser modificadas para expressar moduladores imunitários, tais como GM-CSF, e utilizados como agentes imunizantes.

Anticorpos anti-idiotípicos anti-PHOR-1 também podem ser utilizados em terapia anti-cancro como uma vacina para induzir uma resposta imunitária a células que expressam uma proteína PHOR-1. Especificamente, a criação de anticorpos anti-idiotípicos é bem conhecida na técnica e pode rapidamente ser adaptada para criar anticorpos anti-idiotípicos anti-PHOR-1 que mimetizam um epitopo numa proteína PHOR-1 (ver, por exemplo, Wagner *et al.*, 1997, *Hybridoma* 16: 33-40; Foon *et al.*, 1995, *J Clin Invest* 96: 334-342; Herlyn *et al.*, 1996, *Cancer Immunol Immunother* 43: 65-76). Um tal anticorpo anti-idiotípico pode ser utilizado em estratégias de vacina de cancro.

Podem ser utilizados métodos de imunização genética para criar respostas profilácticas ou terapêuticas humorais e celulares imunitárias dirigidas contra células de cancro expressando PHOR-1. As construções compreendendo

DNA codificando uma proteína/imunogénio PHOR-1 e sequências reguladoras apropriadas podem ser injectadas directamente no músculo ou pele de um indivíduo, de modo a que as células do músculo ou pele integram a construção e expressam a proteína/imunogénio codificada por PHOR-1. A expressão da proteína imunogénio PHOR-1 resulta na criação de imunidade profiláctica ou terapêuticas humoral e celular contra o cancro da próstata e outros cancros que expressam PHOR-1. Podem ser utilizadas várias técnicas de imunização genética profiláctica e terapêutica (para revisão, ver informação e referências publicadas no endereço de Internet www.genweb.com).

ESTOJOS ("KITS")

Para utilização nas aplicações de diagnóstico e terapêutica descritos ou sugeridos acima, os estojos ("kits") são também proporcionados pela invenção. Esses estojos ("kits") podem compreender um meio de veículo sendo compartimentalizado para receber em estrito confinamento um ou mais meios de recipiente tais como frascos, tubos, e semelhantes, cada um dos meios de recipiente compreendendo um dos elementos separados para serem utilizados no método. Por exemplo, um dos recipientes pode compreender uma sonda que é ou pode ser marcada de forma detectável. Essa sonda pode ser um anticorpo ou polinucleótido específico para uma proteína PHOR-1 ou um gene PHOR-1 ou mensagem, respectivamente. Quando o estojo ("kit") utiliza hibridação de ácido nucleico para detectar o ácido nucleico alvo, o estojo

("kit") também pode possuir recipientes contendo nucleótido(s) para amplificação da sequência de ácido nucleico alvo e/ou um recipiente compreendendo um meio repórter, tal como uma proteína de ligação a biotina, tais como avidina ou estreptavidina, ligada a uma molécula repórter, tais como um marcador enzimático, fluorescente, ou radioisotópico.

O estojo ("kit") da invenção irá tipicamente compreender o recipiente acima descrito e um ou mais outros recipientes compreendendo materiais desejáveis do ponto de vista comercial e do utilizado, incluindo tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas, e inserções na embalagem com instruções para utilização. Pode estar presente um marcador no recipiente para indicar que a composição é utilizada para uma aplicação terapêutica ou não terapêutica específica, e pode também indicar instruções para qualquer utilização quer *in vivo* ou *in vitro*, tais como aqueles acima descritos.

O cDNA de PHOR-1 foi depositado nos termos do Tratado de Budapeste em 2 de Julho de 1999, com a American Type Culture Collection (ATCC; 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA) como o plasmídeo p101P3A11, e foi-lhe atribuído o No. de Acesso PTA-312.

EXEMPLOS

São ainda descritos vários aspectos da invenção e

ilustrado a título dos vários exemplos que se seguem, nenhum dos quais se pretende que limite o âmbito da invenção.

Exemplo 1: Isolamento Criado por SSH de Fragmento de cDNA do Gene PHOR-1

Materiais e Métodos

Xenoenxertos LAPC:

Foram obtidos xenoenxertos de LAPC do Dr. Charles Sawyers (UCLA) e criados como descrito (Klein et al, 1997, *Nature Med.* 3: 402-408; Craft et al., 1999, *Cancer Res.* 59: 5030-5036). Os x LAPC-4 dependentes e independentes de androgénio (LAPC-4 AD e AI, respectivamente) e xenoenxertos LAPC-9 (LAPC-9 AD e AI, respectivamente) foram cultivados em ratinhos SCID machos intactos e ou em machos castrados, respectivamente, e foram passados como bocados de tecido pequenos em recipientes machos. Os xenoenxertos LAPC-4 AI foram derivados dos tumores LAPC-4 AD e os xenoenxertos LAPC-9 AI foram derivados de tumores LAPC-9 AD. Para criar os xenoenxertos AI, os ratinhos machos comportando tumores LAPC AD foram castrados e mantidos durante 2-3 meses. Após os tumores LAPC terem sido re-cultivados, os tumores foram recolhidos e passados por machos castrados ou em ratinhos fêmeas SCID.

Linhas Celulares:

Linhas celulares humanas (e.g., HeLa) foram obtidas da ATCC e foram mantidas em DMEM com soro de vitela fetal a 10%.

Isolamento de RNA:

O tecido tumoral e linhas celulares foram homogeneizados em reagente de Trizol (Life Technologies, Gibco BRL) utilizando 10 mL/g tecido ou 10 mL/10⁸ células para isolar o ADN total. O ARN poli A foi purificado a partir do RNA total utilizando Qiagen's Oligotex mRNA Mini e Midi estojos ("kits"). O RNA total e mRNA foi quantificado por análise espectrofotométrica (D.O. 260/280 nm) e analisado por electroforese em gel.

Oligonucleótidos:

Foram utilizados os seguintes oligonucleótidos purificados por HPLC.

DPNCDN (iniciador de síntese de cDNA) (SEQ ID NO: 21):

5'TTTTGATCAAGCTT303'

Adaptador 1 (SEQ ID NO: 22 e 23, respectivamente):

5'CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCCGGGCAG3'

3'GGCCCGTCCTAG5'

Adaptador 2 (SEQ ID NO: 24 e 25, respectivamente):
5'GTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAG3'
3'CGGCTCCTAG5'

Iniciador 1 de PCR (SEQ ID NO: 26):
5'CTAATACGACTCACTATAGGGC3'

Iniciador interno (NP)1 (SEQ ID NO: 27):
5'TCGAGCGGCCGCCCCGGGCAGGA3'

Iniciador interno (NP)2 (SEQ ID NO: 28):
5'AGCGTGGTCGCGGCCGAGGA3'

Hibridação Subtractiva de Supressão:

Foi utilizada hibridação subtractiva de supressão (SSH) para identificar cDNAs correspondentes aos genes que podem ser regulados positivamente em cancro da próstata dependente de androgénio, em comparação com cancro independente de androgénio.

cDNAs de cadeia dupla correspondendo ao xenoenxerto LAPC-4 AD 14 dias após castração (de teste/"tester") e o xenoenxerto LAPC-4 AD (condutor/"driver") foram sintetizados a partir de 2 µg de RNA poli(A)+ isolado a partir de tecido do xenoenxerto, como descrito acima, utilizando CLONTECH's PCR-Select cDNA Subtraction Kit e 1 ng de oligonucleótido DPNC DN como iniciador. A síntese da primeira cadeia e da segunda cadeia foram realizadas como

descrito no protocolo do manual de utilizador do Kit (Protocolo CLONTECH No. PT1117-1, N° de Catálogo K1804-1). O cDNA resultante foi digerido com *Dpn* II durante 3 h. a 37 °C. O cDNA digerido foi extraído com fenol/clorofórmio (1:1) e precipitado com etanol.

O cDNA do condutor (LAPC-4 AD) foi criado combinando numa proporção de 1:1 cDNA de LAPC-4 AD digerido com *Dpn* II com uma mistura de cDNAs digeridos derivados de hiperplasia humana prostática benigna (BPH), as linhas celulares humanas HeLa, 293, A431, Colo205, e fígado de ratinho.

O cDNA do "tester" (LAPC- 4 AD, 14 dias após castração) foi criado diluindo 1 µL de LAPC-4 AD digerido com *Dpn* II 14 dias após cDNA de castração (400 ng) em 5 µL de água. O cDNA diluído (2 µL, 160 ng) foi então ligado a 2 µL de Adaptador 1 e Adaptador 2 (10 µM), em reacções de ligação separadas, num volume total de 10 µL a 16 °C durante a noite, utilizando 400 U de T4 DNA ligase (CLONTECH). A ligação foi terminada com 1 µL de EDTA a 0,2 M e aquecendo a 72 °C durante 5 min.

A primeira hibridação foi efectuada opor adição de 1,5 µL (600 ng) de cDNA condutor para cada um de dois tubos contendo 1,5 µL (20 ng) de cDNA de teste ligado ao Adaptador 1 e Adaptador 2. Num volume final de 4 µL, as amostras foram cobertas com óleo mineral, desnaturadas num termociclador MJ Research a 98 °C durante 1,5 minutos, e

depois foram deixadas a hibridar durante 8 hrs a 68 °C. As duas hibridações foram então misturadas uma com a outra com 1 µL adicional de cDNA condutor desnaturado de fresco e foram deixados a hibridar durante a noite a 68 °C. A segunda hibridação foi então diluída em 200 µL de 20 mM de Hepes, pH 8,3, 50 mM de NaCl, 0,2 mM de EDTA, aquecidos a 70 °C durante 7 min. e armazenados a -20 °C.

Amplificação por PCR, Clonagem e Sequenciação de Fragmentos de Genes produzidos a partir de SSH:

Para amplificar os fragmentos do gene resultantes a partir de reacções de SSH, foram efectuadas duas amplificações por PCR. Na reacção de PCR primária foi adicionado 1 µL da mistura de hibridação final diluída a 1 µL do iniciador 1 de PCR (10 µM), 0,5 µL de dNTP mix (10 µM), 2,5 µL de tampão de reacção 10x (CLONTECH) e 0,5 µL de 50 x Advantage cDNA polymerase Mix (CLONTECH) num volume final de 25 µL. O PCR 1 foi conduzido utilizando as seguintes condições: 75 °C durante 5 min., 94 °C durante 25 s, depois 27 ciclos de 94 °C durante 10 s, 66 °C durante 30 s, 72°C durante 1,5 min. Foram realizadas cinco reacções de PCR primárias separadas para cada experiência. Os produtos foram misturados e diluídos 1:10 com água. Para a reacção de PCR secundária, foi adicionado 1 µL da reacção de PCR primária misturada e diluída com a mesma mix de reacção como utilizado para o PCR 1, excepto que os iniciadores NP1 e NP2 (10 µM) foram utilizados em vez do iniciador 1 de PCR. O PCR 2 foi efectuado utilizando 10-12

ciclos de 94 °C durante 10 s, 68 °C durante 30 s, 72°C durante 1,5 minutos. Os produtos de PCR foram analisados utilizando electroforese em gel de agarose a 2%.

Os produtos de PCR foram inseridos no pCR2.1 utilizando o T/A vector cloning estojo ("kit") (Invitrogen). As *E. coli* transformadas foram sujeitas a selecção por ampicilina e azuis/brancas. As colónias brancas foram repicadas e arranjadas em placas de 96 poços e foram cultivados em cultura líquida durante a noite. Para identificar as inserções, a amplificação por PCR foi efectuada em 1 mL de cultura bacteriana utilizando as condições de PCR1 e NP1 e NP2 como iniciadores. Os produtos de PCR foram analisados utilizando electroforese em gel de agarose a 2%.

Os clones bacterianos foram armazenados em 20% de glicerol num formato de 96 poços. O DNA plasmídico foi preparado, sequenciado, e sujeito a pesquisas de homologia com ácidos nucleicos nas bases de dados do GenBank, dBest, e NCI-CGAP.

Análise da Expressão por RT-PCR:

As primeiras cadeias de cDNAs foram produzidas a partir de 1 µg de mRNA com iniciação com oligo (dT)12-18 utilizando o sistema Gibco-BRL Superscript Pre-amplification. O protocolo do fabricante foi utilizado e foi incluída uma incubação durante 50 min a 42 °C com transcriptase reversa seguida por tratamento com RNase H a 37 °C

durante 20 min. Após completar a reacção, o volume foi aumentado para 200 µL com água antes da normalização. As primeiras cadeias de cDNAs de 16 diferentes tecidos normais humanos foram obtidos de Clontech.

A normalização da primeira cadeia de cDNAs de tecidos múltiplos foi efectuada utilizando os iniciadores 5' atatcgccgcgctcgtcgtcgacaa 3' (SEQ ID NO: 29) e 5' agccacacgcagct cattgtagaagg 3' (SEQ ID NO: 30) para amplificar a β -actina. A primeira cadeia de cDNA (5 µL) foi amplificada num volume total de 50 µL contendo 0,4 µM de iniciadores, 0,2 µM de cada dNTPs, tampão 1XPCR (Clontech, 10 mM de Tris-HCL, 1,5 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, pH 8,3) e 1X Klentaq DNA polimerase (Clontech). Foram removidos cinco µL da reacção de PCR a 18, 20, e 22 ciclos e utilizados para electroforese em gel de agarose. O PCR foi efectuado utilizando um termociclador MJ Research sob as seguintes condições: desnaturação inicial foi a 94°C durante 15 s, seguido por 18, 20, e 22 ciclos de 94°C durante 15 s, 65 °C durante 2 min, 72 °C durante 5 s. Uma extensão final de 72°C foi efectuada durante 2 min. Após electroforese em gel de agarose, as intensidades de bandas das bandas de 283 bp de β -actina a partir de tecidos múltiplos foram comparadas por inspecção visual. Os factores de diluição para a primeira cadeia de cDNAs foram calculados para resultarem em iguais intensidades de bandas da β -actina em todos os tecidos após 22 ciclos de PCR. Foram necessárias três rondas de normalização para conseguir iguais intensidades de bandas em todos os tecidos após 22 ciclos de PCR.

Para determinar os níveis de expressão do gene PHOR-1 gene, foram analisados 5 µL de primeira cadeia de cDNA normalizada por PCR utilizando 25, 30, e 35 ciclos de amplificação utilizando os seguintes pares de iniciadores, que foram concebidos com auxílio (MIT; para detalhes ver, www.genome.wi.mit.edu) (SEQ ID NO: 31 e 32, respectivamente):

101P3A11.1 ATCCTGACTAGGTTGTGGTTGGAG

101P3A11.2 TGTGTTGGGAGTTCTAAAGAGGA

A análise de expressão semi-quantitativa foi conseguida comparando os produtos de PCR em número de ciclos que produzem intensidades de bandas luminosas.

Resultados

Foram conduzidas várias experiências de SSH como descrito em Materiais e Métodos, *supra*, e levou ao isolamento de numerosos clones de fragmentos genes candidatos. Todos os clones candidatos foram sequenciados e sujeitos a análise de homologia contra todas as sequências nas maiores bases de dados públicas de genes e ESTs de modo a proporcionar informação na identidade do gene correspondente e para auxiliar a decisão de analisar um gene particular para expressão diferencial. Em geral, os fragmentos do gene que não possuíam homologia com qualquer sequência conhecida em qualquer das bases de dados pesqui-

sadas, e assim foi considerado que representava novos genes, assim como fragmentos de genes apresentando homologia com sequências expressas marcadas (ESTs) previamente sequenciadas, foram sujeitos a análise de expressão diferencial por RT-PCR e/ou análise de northern.

Um dos clones SSH, compreendendo cerca de 427 bp, não apresentou homologia com qualquer gene conhecido, e foi designado 101P3A11. Este clone representa um fragmento do cDNA de comprimento total que codifica PHOR-1 como apresentado na FIG. 1A (ver também Exemplo 2). A sequência do fragmento SSH 101P3A11 é apresentada na FIG. 3.

A análise inicial de RT-PCR (FIG. 5A-B) apresentou a expressão de 101P3A11 apenas na próstata, LAPC-4 AD, LAPC-4 AD ao dia 3 e LAPC-4 AD ao dia 14 após castração, mas não em LAPC-4 AI. Foi detectada uma expressão inferior no ovário.

Exemplo 2: Isolamento de cDNA de Comprimento Total que Codifica PHOR-1

Um cDNA de comprimento total (GTH10) de 3136 bp foi isolado a partir de uma biblioteca de próstata, revelando uma ORF de 317 aminoácidos (FIG. 1A-D). A sequência de proteína revela 7 domínios transmembranar e possui homologia com os receptores da proteína G-acoplada (GPCRs) envolvida no olfacto (Raming *et al.*, 1993, *Nature* 361: 353; Malnic *et al.*, 1999, *Cell* 96:713). A sequência mais homóloga com 101P3A11 é a de um receptor olfáctico de

rato expressado no cérebro conhecido como RA1c (Raming *et al.*, 1998, *Receptor Channels* 6: 141). É 59,9% idêntica a RA1c na sobreposição de 299resíduos. O homólogo humano de RA1c é provavelmente HPRAJ70, um GPCR específico da próstata identificado pelo Human Genome Sciences (US 5756309, WO 96/39435). Os alinhamentos de ambos os genes com 101P3A11 são apresentados na FIG. 2. O cDNA de comprimento total 101P3A11 codifica uma sequência de aminoácidos que é 59,4% idêntica a HPRAJ70 numa sobreposição de 298 resíduos. A homologia de 101P3A11 com receptores olfactivos cerebrais leva-nos a denominar o gene Homólogo da Próstata do Receptor Olfactivo 1 (PHOR-1). As proteínas que são membros desta família de receptores exibem um terminal amino extracelular, três ansas extracelulares adicionais, três ansas intracelulares e um terminal carboxilo intracelular. A segunda região extracelular de PHOR-1 exibe um potencial sítio de N-glicosilação no resíduo 90 (NST) sugerindo que a proteína pode ser glicosilada.

O cDNA de comprimento total PHOR-1 (p101P3A11, clone GTH10) foi depositado na American Type Culture Collection em 2 de Julho de 1999, e foi-lhe atribuído o número de acesso PTA-312.

Exemplo 3: Análise da Expressão do gene de PHOR-1

A expressão de mRNA de PHOR-1 em tecidos normais humanos foi primeiro analisada por transferência de northern de dois transferidos de tecidos múltiplos

(Clontech; Palo Alto, Califórnia), compreendendo um total de 16 tecidos humanos normais diferentes, utilizando fragmento 101P3A11 SSH marcado (Exemplo 1) como uma sonda. As amostras de RNA foram quantitativamente normalizadas com uma sonda para a β -actina. Os resultados desta análise são apresentados na FIG. 6A-C. A expressão de um transcrito de 3,5 kb foi apenas detectada na próstata normal.

A expressão de PHOR-1 em tecidos normais foi posteriormente analisada utilizando uma transferência por gota de RNA multi-tecido contendo 76 amostras diferentes (representando maioritariamente tecidos normais assim como algumas linhas de células de cancro) demonstraram uma forte expressão de PHOR-1 apenas na próstata (FIG. 7). É detectada uma expressão significativamente menor em tecidos cardíacos.

Adicionalmente, a RT-PCR pode ser utilizada para analisar a expressão de PHOR-1 em vários tecidos, incluindo cancros derivados de doentes. As primeiras cadeias de cDNA são produzidas a partir de 1 μ g de mRNA com oligo (dT)12-18 a iniciar utilizando o sistema Gibco-BRL Superscript Pre-amplification. O protocolo dos fabricantes pode ser utilizado e inclui uma incubação durante 50 min a 42 °C com transcriptase reversa seguida por tratamento com RNase H a 37 °C durante 20 min. Após completar a reacção, o volume é aumentado para 200 μ L com água antes da normalização. As primeiras cadeias de cDNAs são preparadas a partir de vários tecidos de interesse. A normalização pode ser

realizada por PCR utilizando iniciadores para a actina e GAPDH. É realizado PCR semi-quantitativo utilizando iniciadores para PHOR-1.

Exemplo 4: Expressão de PHOR-1 em Xenoenxertos de Cancro da Próstata e Amostras de Doentes

Análise de Northern de Xenoenxertos de Cancro da Próstata e Amostras clínicas

Para analisar a expressão de PHOR-1 em tecidos de cancro da próstata, a transferência de northern foi realizada em RNA derivado de xenoenxertos LAPC e de um painel de amostras de cancro da próstata com o seu tecido normal adjacente da próstata combinado. Os resultados mostram níveis de expressão de PHOR-1 elevados em LAPC-4 AD, LAPC-9 AD, e LAPC-9 AI. É detectada expressão inferior na próstata normal e não é observada expressão em LAPC-4 AI (FIG. 8). A análise de 4 pares combinados de amostras clínicas normal/tumor derivadas de doentes com cancro da próstata apresentam expressão de PHOR-1 em todas as amostras do doente (FIG. 8). De modo interessante, em 3 de 4 pares combinados, a expressão de PHOR-1 foi 5-20 vezes superior nas amostras de tumor em comparação com o tecido adjacente normal combinado. Estes resultados sugerem que a PHOR-1 específica da próstata é sobre-regulada no cancro e que pode ter um papel funcional na patologia do cancro da próstata.

Análises de Northern e de Transferência por Gota de Amostras de Doentes Tumor/Normal Combinadas

A análise de northern e de transferência por gota apresentou uma sobre-regulação de PHOR-1 em 8 de 10 tumores de cancro da próstata (classificação de Gleason de 6 a 9) quando comparada com os seus tecidos adjacentes normais (Figura 9A-B). As transferências por gota utilizando cDNAs amplificados a partir de doentes (Clontech, CA) mostram sobre-regulação de PHOR-1 em 3/3 doentes com cancro da próstata, 6/14 doentes com cancro do rim, 2/8 cancros uterinos, 1/1 cancro cervical, 3/8 cancro do estômago, e em 7/7 doentes com cancro rectal (Figura 10).

RNA in situ

A análise de RNA *in situ* utilizando uma ribo-sonda anti-sentido de PHOR-1 apresentou expressão significativa de epitelial glandular e de células basais em próstata normal (4/4), PIN (1/1), e doentes com cancro da próstata (6/6). A ribo-sonda PHOR-1 com sentido produzia pouca coloração ou não produzia. A coloração de RNA *in situ* em PIN e cancro da próstata é apresentada na Figura 11A-B. A intensidade de coloração em células de cancro foi geralmente superior à observada em glândulas normais (Figura 12A-B). Os resultados do RNA *in situ* também demonstram que a expressão observada nos tecidos da próstata está no epitélio glandular, células basais, e células de cancro.

Exemplo 5: Expressão de proteína PHOR-1 Recombinante em Células bacterianas

Construções pGEX

Para expressar PHOR-1 em células bacterianas, as porções de PHOR-1 foram fundidas com o gene da glutathione S-transferase (GST) por clonagem em pGEX-2T ou pGEX-6P-1 (Amersham Pharmacia Biotech, NJ). Todas as construções foram realizadas para produzir proteínas recombinantes de sequência PHOR-1 com GST fundidas no terminal N com ou sem um epítipo de seis histidinas no terminal C. A marcação do epítipo de seis histidinas foi produzida pela adição de códons de histidina ao iniciador de clonagem na extremidade 3' da ORF. Um sítio de reconhecimento de Thrombin ou PreScissionTM permite a clivagem da marca GST de PHOR-1 ou das construções pGEX-2T e pGEX-6P-1, respectivamente. O gene de resistência da ampicilina e a origem de pBR322 permite a selecção e manutenção do plasmídeo em *E. coli*. Os seguintes fragmentos de PHOR-1 foram clonados no pGEX-6P-1:

Aminoácidos 128 a 238

Aminoácidos 188 a 317

Aminoácidos 100 a 295

Foi clonado o seguinte fragmento de PHOR-1 no pGEX-2T:

Aminoácidos 86 a 310.

Podem ser realizadas construções adicionais em pGEX-6P-1 que cobrem as regiões seguintes da proteína PHOR-1:

Aminoácidos 1 a 128

Aminoácidos 1 a 188

Aminoácidos 1 a 317

Aminoácidos 52 a 238.

Construções pMAL

Para expressar PHOR-1 em células bacterianas, as porções de PHOR-1 foram fundidas com o gene da proteína de ligação a maltose (MBP) pela clonagem no pMAL-c2X e pMAL-p2X (New England Biolabs, MA). Todas as construções foram realizadas para produzir proteínas recombinantes com a sequência de PHOR-1 com MBP fundidas no terminal N e com um epitopo com seis histidinas no terminal C. A marca do epitopo de seis histidinas foi produzida pela adição dos códons de histidina no iniciador de clonagem a 3'. Um sítio de reconhecimento do Factor Xa permite a clivagem da marca GST de PHOR-1. Os vectores pMAL-c2X e pMAL-p2X são otimizados para expressar a proteína recombinante no citoplasma ou periplasma, respectivamente. A expressão no periplasma aumenta a organização de proteínas com ligações persulfureto. Os aminoácidos PHOR-1 86 a 310 foram clonados em pMAL-c2X e pMAL-p2X.

As construções adicionais podem ser realizadas em pMAL-c2X e pMAL-p2X cobrindo as seguintes regiões da proteína PHOR-1:

Aminoácidos 1 a 128

Aminoácidos 1 a 188

Aminoácidos 1 a 317

Aminoácidos 52 a 238

Aminoácidos 100 a 295

Aminoácidos 128 to 238

Aminoácidos 188 a 317.

Exemplo 6: Expressão da Proteína Recombinante PHOR-1 em Sistemas de Mamífero

Construção de pcDNA4/HisMax-TOPO

Para expressar PHOR-1 em células de mamífero, a ORF de 951 bp PHOR-1 foi clonada no pcDNA4/HisMax-TOPO Versão A (cat# K864-20, Invitrogen, Carlsbad, CA). A expressão da proteína é conduzida pelo promotor de citomegalovírus (CMV) e o estimulador de tradução SP163. A proteína recombinante possui Xpress™ e seis epitopos de histidina em fusão com o terminal N. O terminal C da proteína recombinante possui uma fusão de 28 aminoácidos resultante das sequências do vector antes do codão de terminação. O vector pcDNA4/HisMax-TOPO também contém o sinal de poliadenilação da hormona do crescimento bovina e a sequência de

terminação de transcrição para aumentar a estabilidade de mRNA em conjunto com a origem de SV40 para replicação epissômica e simples resgate do vector em linhas de células que expressam o antígeno T grande. O gene de resistência à Zeocina permite a selecção de células de mamífero que expressam a proteína e o gene de resistência a ampicilina e origem de ColE1 permitem a selecção e manutenção do plasmídeo em *E. coli*.

Construção de pcDNA3.1/MycHis

Para expressar as células PHOR-1 em células de mamífero, a ORF de 951 bp de PHOR-1 ORF foi clonada no pcDNA3.1/MycHis Versão A (Invitrogen, Carlsbad, CA). A expressão de proteína é conduzida pelo promotor de citomegalovírus (CMV). A proteína recombinante possui myc e seis histidinas fundidas com o terminal C. O vector pcDNA3.1/MycHis também contém o sinal de poliadenilação da hormona do crescimento bovino (BGH) e a sequência de terminação de transcrição para aumentar a estabilidade do mRNA em conjunto com a origem de SV40 para a replicação epissômica e simples resgate do vector em linhas de células que expressam o antígeno T grande. O gene da resistência a Neomicina permite a selecção de células de mamífero que expressam a proteína e o gene de resistência a ampicilina e a origem ColE1 permitem a selecção e manutenção do plasmídeo em *E. coli*.

Construção de pcDNA3.ICT-GFP-TOPO

Para expressar PHOR-1 em células de mamífero e para permitir a detecção da proteína recombinante utilizando fluorescência, a ORF de 951 bp foi clonada no pcDNA3.ICT-GFP-TOPO (Invitrogen, CA). A expressão de proteína é conduzida pelo promotor do citomegalovírus (CMV). A proteína recombinante possui a proteína fluorescente (GFP) em fusão com o terminal C facilitando a detecção não-invasiva, *in vivo* e estudos de biologia molecular. O vector pcDNA3.1/MycHis também contém o sinal de poliadenilação da hormona do crescimento bovino (BGH) e a sequência de terminação de transcrição para estimular a estabilidade de mRNA em conjunto com a origem de SV40 para replicação epissômica e simples resgate do vector em linhas de células que expressam o antígeno T grande. O gene de resistência a neomicina permite a selecção de células de mamífero que expressam a proteína e o gene de resistência a ampicilina e a origem ColE1 permitem a selecção e manutenção do plasmídeo em *E. coli*.

Pode ser efectuada uma construção adicional com uma fusão com GFP N-terminal em pcDNA3.1NT-GFP-TOPO que cobre na totalidade o comprimento da proteína PHOR-1.

Construções de pSRa

Para produzir linhas de células de mamífero que expressam PHOR-1 constitutivamente, a ORF de 951 bp foi

clonada em construções de pSRa e foram produzidas linhas de células estáveis. Os retrovírus anfotrópicos e ecotrópicos são produzidos por transfecção de construções de pSRa na linha de empacotamento 293T-10A1 ou co-transfecção de pSRa e um plasmídeo auxiliar (ϕ -) em células 293, respectivamente. Os retrovírus podem ser utilizados para infectar uma variedade de linhas de células de mamífero, resultando na integração do gene clonado, PHOR-1, nas linhas de células hospedeiras. A expressão de proteína é conduzida desde uma longa repetição terminal (LTR). O gene de resistência a Neomicina permite a selecção de células de mamífero que expressam a proteína e o gene de resistência a ampicilina e a origem ColE1 permite a selecção e manutenção do plasmídeo em *E. coli*. Foi feita uma construção adicional de pSR α que fundia a marca FLAG com o terminal C para permitir a detecção utilizando anticorpos anti-FLAG anti. A sequência FLAG 5' gat tac aag gat gac gac gat aag 3' (SEQ ID NO: 33) foi adicionada ao iniciador de clonagem na extremidade 3' da ORF.

Podem ser realizadas construções adicionais de pSR α para produzir proteínas de fusão N-terminais e C-terminais com GFP e myc/6 HIS com a proteína PHOR-1 de comprimento total.

Exemplo 7: Produção de PHOR-1 Recombinante num Sistema de Baculovírus

Para produzir uma proteína PHOR-1recombinante num

sistema de expressão de baculovírus, o cDNA de PHOR-1 é clonado no vector de transferência de baculovírus pBlueBac 4.5 (Invitrogen), que proporciona uma marca His no terminal N. Especificamente, o pBlueBac-PHOR-1 é co-transfectados com o plasmídeo auxiliar pBac-N-Blue (Invitrogen) em células de insecto SF9 (*Spodoptera frugiperda*) para produzir baculovírus recombinantes (ver manual de instruções da Invitrogen para detalhes). O baculovírus é então recolhido a partir do sobrenadante das células e purificado por ensaio em placa.

A proteína recombinante PHOR-1 é então produzida por infecção com células de insecto HighFive (Invitrogen) com o baculovírus purificado. A proteína PHOR-1 recombinante pode ser detectada utilizando anticorpo anti-PHOR-1. A proteína PHOR-1 pode ser purificada e utilizada em vários ensaios com base em células ou como imunogénio para produzir anticorpos policlonais e monoclonais específicos para PHOR-1.

Exemplo 8: Anticorpos Policlonais e Monoclonais contra PHOR-1

Foram derivados três imunogénios de modo a produzir reagentes de anticorpo que se ligassem especificamente a PHOR1. Dois antigénios foram péptidos que codificavam os aminoácidos 1-14 (MVDPNGNESSATYF; SEQ ID NO: 8) e os aminoácidos 262-274 (VHRFSKRKRDSPPLP; SEQ ID NO: 9) da sequência da proteína PHOR-1. Estes péptidos são

previstos codificar o terminal N extracelular e a ansa extracelular entre os 6° e 7° domínios putativos da membrana, respectivamente, da proteína PHOR1, que é o sítio esperado de ligação ao ligando. O terceiro imunogénio foi uma proteína de fusão glutathione-S-transferase (GST) que incluía os aminoácidos 86-310 da sequência de proteína de PHOR-1. Esta proteína de fusão foi produzida por amplificação mediada por PCR dos nucleótidos 388-1062 do clone de cDNA de PHOR-1 com os seguintes iniciadores (SEQ ID NO: 34,35, respectivamente):

5' PRIMER CCGAATTCATCTTCTGGTTCAATTTC
EcoRI

3' PRIMER CCTCTCGAGTTCACATGGAAAAGTCGAAG
XhoI

O produto resultante foi clonado nos sítios de restrição *EcoRI* e *XhoI* do vector de fusão com GST pGEX-2T (Pharmacia). A proteína de fusão recombinante GST-PHOR-1 foi purificada a partir de bactérias induzidas através de cromatografia de afinidade em glutathione-sepharose.

Em adição aos antígenos acima, outros péptidos e proteínas produzidas por bactérias e vírus baculovírus que codificam outras regiões da sequência de proteína de PHOR-1 podem ser utilizados para produzir reagente de anticorpo específico para PHOR-1. Estes reagentes podem ser dirigidos para regiões da proteína PHOR-1 que podem modular a função

de PHOR-1, tal como um anticorpo que bloqueia a ligação ao ligando. Estes reagentes podem ser utilizados para elucidar a função e vias de transdução de sinal da proteína PHOR-1.

Produção de Anticorpos Policlonais

Para produzir soros policlonais contra PHOR-1, a proteína de fusão com GST purificada e os péptidos acoplados a hemocianina de lapa (KLH) foram utilizados para imunizar coelhos individualmente como se segue. Os coelhos foram imunizados com 200 µg de proteína de fusão ou anti-génio KLH-péptido misturado em adjuvante de Freund completo. Os coelhos foram então injectados a cada duas semanas com 200 µg de imunogénio em adjuvante de Freund incompleto. Os sangues de teste foram retirados aproximadamente 7-10 dias a seguir a cada imunização. O título de cada anti-soro de péptido foi, pelo menos, 1×10^5 como determinado por ELISA para os respectivos imunogénios. O título do soro para a fusão com GST foi de, pelo menos, 1×10^6 .

Os anti-soros contra o péptido foram purificados por afinidade por passagem do soro numa coluna de afinidade composta pelo respectivo péptido covalentemente acoplado a uma matriz Affigel (BioRad). O soro produzido contra a fusão com GST é semi-purificado primeiro por remoção do anticorpo reactivo para GST por passagem numa coluna de afinidade para GST. O anticorpo específico para PHOR-1 é então isolado pela passagem numa coluna de afinidade de GST-PHOR-1. Alternativamente, o anti-soro específico para

PHOR-1 pode ser isolado por cromatografia de afinidade utilizando uma proteína de fusão com uma proteína de ligação a maltose (MBP)-PHOR-1 que codifica os mesmos aminoácidos. O soro purificado por afinidade a partir de coelhos imunizados com o péptido N-terminal da sequência PHOR-1 imunoprecipita a proteína PHOR-1 a partir de lisados de células transfectadas com cDNA de PHOR-1 (Figura 13A-B) e detecta a expressão à superfície da célula da proteína PHOR-1 por análise de citometria de fluxo de células transfectadas (Figura 14A-B).

Produção de Anticorpos Monoclonais de Murino

Para produzir mAbs contra PHOR-1, foram imunizados ratinhos Balb C intraperitonealmente com 200 µg de proteína de fusão GST-PHOR-1 misturada em adjuvante de Freund completo. Os ratinhos foram então subsequentemente imunizados todas as 2-4 semanas com 200 µg de antígeno misturado em adjuvante de Freund incompleto. Após 3 imunizações os títulos dos sangues de teste destes ratinhos foram, pelo menos, $1,2 \times 10^6$ determinados por ELISA e reconheciam especificamente a sequência de aminoácidos de PHOR-1 conforme demonstrado por transferência de western utilizando uma proteína de fusão MBP que codifica os mesmos aminoácidos presentes na fusão com GST (Fig. 15). A análise de citometria de fluxo das células LNCaP e células de xenoinxerto LAPC9 mostram um desvio fluorescente quando coradas com uma combinação de sangues de ratinho imunizados em comparação com os seus soros pré-ímmes da mesma origem

demonstrando a detecção da proteína PHOR-1 à superfície celular (Fig. 16A-B).

Uma vez obtidas a reactividade e especificidade apropriadas, conforme determinado por ELISA, as análises de transferência de western e de citometria de fluxo, fusão e produção de hibridoma são então efectuadas com procedimentos estabelecidos bem conhecidos na técnica (Harlow e Lane, 1988).

Antigénios alternativos e estratégias de imunização podem também ser utilizados para produzir mAbs com reactividade específica e especificidade para várias regiões da proteína PHOR-1. Estes antigénios podem incluir péptidos adicionais e proteínas recombinantes produzidas por bactérias ou baculovírus que codificam várias regiões da sequência da proteína PHOR-1. Pode também ser utilizada uma estratégia de imunização à base de células em que o cDNA de PHOR-1 é sobre-expresso em células tal como nos fibroblastos de ratinho NIH3T3 ou células B 300.19 de murino e células totais ou preparações de membrana a partir destas células são utilizadas como imunogénios.

Exemplo 9: Caracterização da Expressão da Proteína PHOR-1

As células 293T foram transientemente transfectadas com o plasmídeo de expressão pCDNA4 HIS/MAX (Invitrogen) em que o cDNA de PHOR-1 é fundido no terminal amino com duas marcas de epitopo, Express e His G. O vector vazio

de controlo e as células transfectadas com PHOR-1 foram coradas com um mAb que reconhece especificamente o epitopo Express N-terminal ou com um pAb de coelho dirigido contra os 14 aminoácidos N-terminais da sequência de PHOR-1. como apresentado na Figura 13A e Figuras 14A-B, as células transfectadas com PHOR-1 demonstram um desvio fluorescente específico em comparação com as células do controlo com os mAb anti-Express e o pAb. Este desvio indica que PHOR-1 é expressada à superfície celular com o terminal N exposto no lado de fora da membrana plasmática, o que é consistente com a topologia dos conhecidos receptores acoplados à proteína G. A expressão de PHOR-1 por estas células foi ainda confirmada por imuno-histoquímica (ver exemplo seguinte).

A imunoprecipitação e análise de western de proteína PHOR-1 com epitopos marcados de células transfectadas mostram uma banda imunorreactiva de 37 kD que coincide com o peso molecular previsto da proteína PHOR-1 deduzido a partir da sequência de aminoácidos (Figura 13B). Adicionalmente, é observado um arrastamento de elevado peso molecular imunorreactivo nas células transfectadas com PHOR-1 que pode representar agregados da proteína insolúveis em SDS e aquecimento mediados pela interacção hidrofóbica dos 7 domínios transmembranares.

O soro de ratinhos imunizados com GST-proteína PHOR-1 foi utilizado para examinar a expressão de proteína endógena de PHOR-1. As células LNCaP e LAPC9 de cancro da

próstata, que expressam ambas mRNA de PHOR-1, exibem um deslocamento de fluorescência quando coradas com soro imunizado em comparação com soro pré-imunizado demonstrando a expressão à superfície celular da proteína PHOR-1 nestas populações de células (Fig 16). Adicionalmente, o exemplo seguinte demonstra a utilização deste soro para detectar a expressão endógena de PHOR-1 em próstata normal, cancro da próstata e linhas de células de cancro da próstata.

A expressão de PHOR-1 foi avaliada por tradução *in vitro* isenta de células. O cDNA de controlo e o cDNA de PHOR-1 foram traduzidos *in vitro* utilizando lisados de reticulócitos de coelho de acordo com as recomendações do fabricante (Promega, Madison, WI). Os resultados do ensaio *in vitro* isento de células são apresentados na Figura 17, e demonstram que o cDNA de PHOR-1 é traduzido numa 38-42 kDa proteína, que corresponde ao peso molecular calculado para PHOR-1.

Exemplo 10: Detecção Imuno-histoquímica de PHOR-1 em Próstata Normal, Cancro da Próstata e Linhas de Células de Cancro da Próstata

Métodos

Blocos de tecidos fixados em formalina, embebidos em parafina foram seccionados com 4 microns e colocados em lâminas de microscópio positivamente carregadas Capillary Gap (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ). Após

remoção de cera em xileno, seguido por hidratação em séries de álcool, as secções de tecido foram pré-tratadas numa panela de pressão 20 minutos na presença de citrato de sódio (10 mM, pH 6,0) seguido por uma incubação de 10 minutos com proteinase K (1:40) de modo a otimizar a reactividade do anticorpo. Após arrefecimento durante 5 minutos, as lâminas foram imunocoradas utilizando uma técnica de biotina-estreptavidina-peroxidase. Resumidamente, as lâminas foram incubadas em soro bloqueante (cabra normal) durante 5 minutos, seguido por 2 µg/mL de anticorpo policlonal de coelho anti-PHOR-1 primário (25 minutos), anticorpo de cabra anti-IgG de coelho biotinilado secundário (25 min), bloqueamento da peroxidase endógena (3 X 1,5 minutos), e complexo de estreptavidina conjugado com a enzima peroxidase, Vector Labs, Burlingame, CA (10 minutos). Entre cada incubação, as secções foram lavadas em tampão. Foi utilizado o cromogénio DAB - Diaminobenzidina (QualTek Molecular Labs) para desenvolver a reacção - produzindo um precipitado castanho. As lâminas foram subsequentemente contrastadas com hematoxilina e cobertas com lamela.

Resultados

A expressão endógena da proteína PHOR-1 é demonstrada na análise de imuno-histoquímica do anti-PHOR-1 (PÉPTIDO 1: aminoácidos 1-14) anticorpo policlonal de coelho (Figura 18A-F). a coloração no cancro da próstata é superior à coloração observada na próstata normal. A

coloração é localizada apicalmente no epitélio luminal da próstata normal (Figuras 18E e 18F). A coloração observada no cancro da próstata está também localizada apicalmente em cancros de grau baixo a intermédio (Figuras 18B e 18C) e em todas as células de cancro da próstata mais avançado (Figura 18A). A linha de células de cancro da próstata, LNCaP também apresenta coloração semelhante (Figuras 18D e 19F) em quase todas as células.

A especificidade do anticorpo policlonal anti-PHOR-1 de coelho (PÉPTIDO 1) é demonstrada na Figura 19A-F. a linha de células manipulada 293T-PHOR-1 (Figura 19B), que expressa a proteína PHOR-1 a partir da construção episómica pcDNA4 HIS/MAX, e a linha de células PC3-PHOR-1 (Figura 19D), que expressa PHOR-1 de forma estável a partir de uma construção integrada pSRa, mostram ambas uma coloração castanha específica que não está presente nas linhas de células parentais, não manipuladas (Figuras 19A e 19C, respectivamente). A coloração na linha de células 293T-PHOR-1 (Figura 19B) é muito forte num subconjunto de células, como é esperado de uma transfecção transiente com uma construção pcDNA4 HIS/MAX que conduz a expressão de PHOR-1 a partir de um promotor de CMV. Contudo, a coloração na linha de células PC3-PHOR-1 (Figura 19D) está presente em todas as células observadas, conforme é esperado numa linha de células estável.

Estes dados demonstram que o anticorpo policlonal de coelho anti-PHOR-1 (PÉPTIDO 1) reconhece especificamente

a proteína PHOR-1. Adicionalmente, a coloração observada em PC3-PHOR-1 (Figura 19D) assemelha-se de forma próxima ao padrão de coloração e intensidade observados na linha de células de cancro da próstata LNCaP (Figura 19F) e no cancro da próstata (Figura 19E).

Exemplo 11: Alteração da Fosforilação de Tirosina e Erk por PHOR-1

As células PC3, que expressam de forma estável neo ou PHOR-1 no vector retroviral pSRa, foram cultivadas em 1% de FBS durante a noite. As células foram então deixadas não tratadas ou foram tratadas com 10% de FBS durante 3 min. As células foram lisadas e analisadas por transferência de western com anti-fosfotirosina (UBI, Lake Placid, NY) (Figura 20A) , ou anti-fosfo-Erk (Cell Signal, Beverly, MA) mAb (Figura 20B). O revestimento com mAb anti-Grb2 (Transduction Laboratories, San Diego, CA) mostra igual carga de proteína (Figura 20C). Na Figura 20D, a expressão de PHOR-1 foi avaliada por transferência de northern. (Ver também Figura 19D para demonstração imuno-histoquímica da expressão de PHOR-1 por células PC3-PHOR-1.) O RNA foi extraído a partir de células controlo PC3-neo e células PC3 transduzidas de forma estável com PHOR-1 e as transferências de RNA foram hibridadas utilizando a sonda de PHOR-1 (fragmento *Xba-Ecor1* do clone GTH10). O RNA dos xenoenxertos LAPC4 foi utilizado como controlo positivo (Figura 20E). Os resultados mostram que o mRNA de PHOR-1 é expressado em células PC3-PHOR-1 transduzidas retroviral-

mente, mas não em células controlo, e que, uma vez expressado, PHOR-1 altera o padrão de fosforilação das células PC3.

A fosforilação de tirosina desempenha um importante papel na transmissão de eventos de sinalização da superfície celular para o núcleo. Além disso, foi demonstrado que a fosforilação da tirosina ocorria via GPCR (Liebmann C, Bohmer FD. *Curr Med. Chem.* 2000,7:911 e Maudsley S, Pierce KL, Zamah AM, Miller WE, Ahn S, Daaka Y, Lefkowitz RJ, Luttrell LM. *J. Biol. Chem.* 2000, 275:9572), e resulta na activação de cascatas de sinalização que contribuem para o efeito da GPCR. Estes resultados (apresentados na FIG. 20A-B) indicam que, quando PHOR-1 é expressado em células PC3 células, induz a fosforilação de tirosina de uma proteína de 55 kDa e a desfosforilação de uma proteína de 130kDa. Adicionalmente, a expressão de PHOR-1 induz um aumento de 2-3 vezes na fosforilação de Erk, uma proteína associada com mitogénese e transformação (Greulich H, Erikson RL, *J Biol Chem.* 1998; 273:13280), indicando que PHOR-1 activa a cascata Erk.

Exemplo 12: PHOR-1 Modula a Concentração Citoplasmática de cAMP

As células parentais e as células que expressam PHOR-1 foram comparadas quanto à sua capacidade para induzir acumulação citoplasmática de cAMP. As células 293T

foram transfectadas com vector pcDNA4 HIS MAX vazio ou com pcDNA4 HIS MAX PHOR-1. As células foram colocadas em jejum em 1% de soro fetal de bovino (FBS) durante a noite e incubadas só com meio ou na presença de 10% de FBS. As células foram lisadas e analisadas quanto ao conteúdo em cAMP por imunoensaio ligado a enzima (EIA) de acordo com as recomendações do fabricante (Linco Research, St Charles, MI). Os resultados são apresentados na Tabela 1, e indicam que a expressão de PHOR-1 altera a concentração de cAMP em resposta a FBS.

Tabela 1

Amostra	cAMP, nM
293T + FBS	20,59
293T-PHOR-1 + FBS	43,08
LAPC4 AD	46,12
LAPC4 AI	63,12

Todos os GPCRs caracterizados, incluindo os receptores olfactivos, funcionam por activação da via do cAMP. Na ausência de ligando, os GPCRs estão normalmente num estado inactivo. Após ligação de ligando ou sobre-expressão, os GPCRs adquirem uma conformação activa e complexam com proteínas G. Esta interacção resulta na dissociação das subunidades da proteína G e a activação de adenilato ciclase, resultando na acumulação de cAMP (Birnbaumer L, *Cell* 1992, 71:1069). A produção estimulada

de cAMP resulta na activação de várias vias de sinalização a jusante que medeiam o efeito das GPCRs. A demonstração neste exemplo de que a expressão de PHOR-1 em 293T células permite a acumulação de cAMP em resposta a FBS indica que PHOR-1 funciona como uma GPCR nestas condições.

Adicionalmente, o conteúdo em cAMP foi determinado para dois xenoinxertos de cancro da próstata que diferem na sua dependência de androgénio e expressão de PHOR-1. O LAPC4AD é um xenoinxerto de cancro da próstata dependente de androgénio que exhibe uma forte expressão de PHOR-1, conforme evidenciado pela transferência de northern apresentada na Figura 20E. O conteúdo em cAMP destas células, também apresentado na Tabela acima, foi significativamente inferior ao das células de LAPC4AI, que são independentes de androgénio e não expressam PHOR-1.

Exemplo 13: PHOR-1 Induz Crescimento de Colónias em Agar Mole

As células NIH-3T3 que expressam PHOR-1 de forma estável foram analisadas quanto à sua capacidade para formar colónias em agar mole. As células NIH-3T3, que expressam de forma estável neo ou Ras activado foram utilizadas como controlos negativo e positivo, respectivamente. A experiência foi efectuada em duplicado. O ensaio foi avaliado 4 semanas após plaqueamento das células. Os resultados são apresentados na Figura 21 e na Tabela 2.

Tabela 2

Número de células		
Células	Média	DP
3T3-Neo	39	12,7
3T3-PHOR	131	15,6
3T3-Ras	46	8,5

A contagem de colónias mostra que PHOR-1 induz um aumento de 3 vezes na formação de colónias relativamente ao controlo neo. Este significativo aumento foi observado em 2 experiências separadas. Estes resultados indicam que a expressão de PHOR-1 em células NIH 3T3 induz um aumento de 3-4 vezes na formação de colónias em comparação com um aumento de 5 vezes pelo forte oncogene Ras, sugerindo que PHOR-1 possui significativas capacidades de transformação.

Exemplo 14: Mapeamento Cromossómico do Gene PHOR-1

A localização cromossómica de PHOR-1 foi determinada utilizando o painel híbrido de radiação GeneBridge4 (Walter *et al.*, 1994, *Nat. Genetics* 7:22) (Research Genetics, Huntsville Al). Foram utilizados os seguintes iniciadores de PCR para localizar PHOR-1 (SEQ ID NO: 31, 32, respectivamente):

101P3A11.1 ATCCTGACTAGGTTGTGGTTGGAG

101P3A11.2 TGTGGTTGGGAGTTCTAAAGAGGA

O vector de mapeamento resultante para os 93 DNAs do painel híbrido de radiação foi:

10000000010010000110100001111010001000020101010000110000000
1000011100 001000000111101100001111

Este vector e o programa de mapeamento em <http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/rhmapper.pl> colocou PHOR-1 no telómero do cromossoma 11 em 11p15.5.

Porque o gene humano PHOR-1 gene mapeia no cromossoma 11p15.5, os polinucleótidos que codificam diferentes regiões da proteína PHOR-1 podem ser utilizados para caracterizar anormalidades citogenéticas no cromossoma 11, banda p15.5 que foram identificadas como estando associadas com vários cancros. Em particular, uma variedade de anormalidades cromossómicas em 11p15.5 foram identificadas como anormalidades citogenéticas frequentes em vários cancros diferentes (ver, e.g., Lai et al., 2000, *Clin. Cancer Res.* 6(8):3172-6; Oya e Schulz, 2000, *Br. J. Cancer* 83(5):626-31; Svaren et al., Set. 12, 2000, *J. Biol. Chem.*). Consequentemente, os polinucleótidos que codificam regiões específicas da proteína PHOR-1 proporcionam novas ferramentas que podem ser utilizadas para delinear com uma maior precisão do que anteriormente era possível, a natureza específica das anormalidades citogenéticas nesta região do cromossoma 11 que pode contribuir para o fenótipo maligno. Neste contexto, estes polinucleótidos satisfazem uma necessidade na técnica para expandir a sensibilidade da pesquisa cromossómica de modo a identificar anormalidades cromossómicas mais subtis e menos comuns (ver, e.g., Evans et al., 1994, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 171(4):1055-1057).

Exemplo 15: Identificação de Potenciais Vias de Transdução de Sinal

Para determinar se PHOR-1 activa directamente ou indirectamente vias de transdução de sinal conhecidas em células, são realizados ensaios repórter de transcrição com base em luciferase (luc) em células que expressam PHOR-1. Estes repórteres de transcrição contêm sítios de ligação de consenso para factores de transcrição conhecidos que se situam a jusante de vias de transdução de sinal bem caracterizadas. Os repórteres e os exemplos dos seus factores de transcrição associados, vias de transdução de sinal, e estímulos de activação são listados a seguir.

1. NFkB-luc, NFkB/Rel; Ik-kinase/SAPK; crescimento/apoptose/stresse
2. SRE-luc, SRF/TCF/ELK1; MAPK/SAPK; crescimento/diferenciação
3. AP-1-luc, FOS/JUN; MAPK/SAPK/PKC; crescimento/apoptose/stresse
4. ARE-luc, receptor de androgénio; esteróides/MAPK; crescimento/diferenciação/apoptose
5. p53-luc, p53; SAPK; crescimento/diferenciação/apoptose
6. CRE-luc, CREB/ATF2; PKA/p38; crescimento/apoptose/stresse

Os efeitos mediados por PHOR-1 podem ser ensaiados em células que apresentam expressão de mRNA. Os

plasmídeos repórter de luciferase podem ser introduzidos por transfecção mediada por lípidos (TFX-50, Promega). A actividade de luciferase, um indicador da actividade de transcrição relativa, é medida por incubação de extractos celulares com substrato de luciferina e a luminescência da reacção é monitorizada num luminómetro.

Exemplo 16: Ensaaios *In Vitro* da Função de PHOR-1

A expressão de PHOR-1 no cancro da próstata proporciona evidência de que este gene possui um papel funcional na progressão de tumor e/ou iniciação de tumor. É possível que PHOR-1 funcione como um receptor envolvido na activação dos sinais de proliferação. A função de PHOR-1 pode ser avaliada em células de mamífero utilizando abordagens *in vitro*. Para a expressão em mamífero, PHOR-1 pode ser clonado em vários vectores apropriados, incluindo pcDNA 3.1 myc-His-tag e o vector retroviral pSRatkneo (Muller *et al.*, 1991, *MCB* 11:1785). Utilizando estes vectores de expressão, PHOR-1 pode ser expressado em várias linhas de células, incluindo PC-3, NIH 3T3, LNCaP e 293T. A expressão de PHOR-1 pode ser monitorizada utilizando anticorpos anti-PHOR-1 e análise de transferência de northern.

As linhas de células de mamífero que expressam PHOR-1 podem ser testadas em vários ensaios *in vitro* e *in vivo*, incluindo proliferação de células em cultura de tecidos, activação de sinais apoptóticos, formação de tumor

em ratinhos SCID, e invasão *in vitro* utilizando um sistema de cultura por invasão de membrana (MICS; Welch *et al.*, *Int. J. Cancer* 43: 449-457). O fenótipo das células PHOR-1 é comparado ao fenótipo das células que sem expressão de PHOR-1.

As linhas de células que expressam PHOR-1 podem também ser ensaiadas quanto a alteração de propriedades invasivas e migratórias medindo a passagem de células através de uma câmara de membrana porosa revestida com matrigel (Becton Dickinson). A passagem de células através da membrana para o lado oposto é monitorizada utilizando um ensaio fluorescente (Becton Dickinson Technical Bulletin #428) utilizando células indicadoras calceína-Am que foram aplicadas (Molecular Probes). As linhas de células analisadas incluem células PC3, NIH 3T3 e LNCaP parentais e que sobre-expressam PHOR-1. Para determinar se as células que expressam PHOR-1 possuem propriedades quimioatrativas, as células indicadoras são monitorizadas quanto à passagem através da membrana porosa para um gradiente de meio condicionado de PHOR-1 em comparação com o meio de controle. Este ensaio pode também ser utilizado para qualificar e quantificar a neutralização específica do efeito induzido por PHOR-1 pelas composições terapêuticas de cancro candidatas.

A função de PHOR-1 pode ser avaliada utilizando a tecnologia de RNA anti-sentido acoplada aos vários ensaios descritos acima, e.g. crescimento, invasão e migração. Os

oligonucleótidos de RNA anti-sentido podem ser introduzidos em células que expressam PHOR-1, evitando, deste modo, a expressão de PHOR-1. As células contendo o controlo e anti-sentido podem ser analisadas quanto a proliferação, invasão, migração, potencial apoptótico e de transcrição. O efeito local assim como sistémico da perda da expressão de PHOR-1 pode ser avaliada.

Exemplo 17: Ensaio In Vivo para Promoção do Crescimento de Tumor por PHOR-1

O efeito da proteína PHOR-1 no crescimento de células tumorais pode ser avaliado *in vivo* por sobre-expressão do gene em ratinhos portadores de tumor. Por exemplo, os ratinhos SCID podem ser injectados subcutaneamente em cada flanco com 1×10^6 de células PC3, TSUPR1, ou DU145 contendo o vector tkNeo ou PHOR-1. Podem ser utilizadas pelo menos duas estratégias: (1) A expressão constitutiva de PHOR-1 sob regulação de um promotor tal como um promotor constitutivo obtido a partir dos genomas de vírus tais como vírus de políoma, vírus da varíola aviária (UK 2,211,504 publicado a 15 de Julho de 1989), adenovírus (tal como Adenovírus 2), vírus do papiloma bovino, vírus do sarcoma aviário, citomegalovírus, um retrovírus, vírus da hepatite-B e Vírus Símio 40 (SV40), ou a partir de promotores heterólogos de mamíferos, e.g., o promotor da actina ou um promotor da imunoglobulina, desde que estes promotores sejam compatíveis com os sistemas de células hospedeiras, e (2) Expressão regulada sob o

controlo de um sistema de vector indutível, tal como ecdisona, tet, etc., desde que estes promotores sejam compatíveis com os sistemas de células hospedeiras. O volume de tumor é então monitorizado pelo aparecimento de tumores palpáveis e seguidos ao longo do tempo para determinar se as células que expressam PHOR-1 crescem a uma taxa de crescimento mais elevada e se os tumores produzidos por células que expressam PHOR-1 demonstram características de agressividade alterada (e.g. metástase estimulada, vascularização, capacidade de resposta reduzida contra fármacos quimioterapêuticos). Adicionalmente, podem ser implantados nos ratinhos 1×10^5 das mesmas células ortotopicalmente para determinar se PHOR-1 produz um efeito no crescimento local na próstata ou na capacidade das células formarem metástases, especificamente para os pulmões, nódulos linfáticos, e medula óssea.

O ensaio é também útil para determinar o efeito inibidor de PHO-1 das composições terapêuticas candidatas, tais como, por exemplo, intracorporos de PHOR-1, moléculas anti-sentido para PHOR-1 e ribozimas.

Exemplo 18: Clonagem de Genes dos Membros da Família PHOR-1

PHOR-1 é homólogo de uma grande família de receptores olfactivos que são expressados no epitélio e neurónios olfactivos. Numa tentativa de identificar genes adicionais que são homólogos de PHOR-1, a sequência de proteína de PHOR-1 foi utilizada como uma sonda electrónica

para identificar membros da família nas bases de dados públicas de EST (etiquetas de sequências de expressão) (dBest). Utilizando a função "tblastn" no NCBI (National Center for Biotechnology Information) a base de dados dBest foi inquirida com a sequência de proteína PHOR-1. Esta análise revelou um novo membro da família (FIG. 22). A EST, AI138213, foi isolada de uma biblioteca placentária humana e é homóloga da região carboxi-terminal de PHOR-1. Exibe 49,5% de identidade com PHOR-1 numa sobreposição de 95 aminoácidos. Este novo membro da família está a ser analisado quanto a expressão em amostras de próstata e cancro da próstata e será clonado a partir de uma biblioteca de cDNA humana.

Uma abordagem alternativa para encontrar novos membros da família é conceber oligonucleótidos degenerados em regiões conservadas do gene (Raming *et al.*, 1993, *Nature* 361:353). Estes podem ser utilizados em reacções de RT-PCR na primeira cadeia de cDNA derivada da próstata ou cancro da próstata para isolar novos membros da família GPCR. Para isolar membros da família de PHOR-1 utilizando RT-PCR, foram escolhidas as seguintes regiões conservadas para concepção de oligonucleótidos: SLHEPMY (a.a. 56-62; SEQ ID NO: 36), AMAFDY (a.a. 119-125; SEQ ID NO: 37), YVAICHP (a.a. 125-131; SEQ ID NO: 38), KAFGTCV (a.a. 237-243; SEQ ID NO: 39), e GVKTKEI (a.a. 294-300; SEQ ID NO: 40). Os oligonucleótidos degenerados utilizados são como se segue:

(1) for SLHEPMY: 1A-5'AGYCTNCAYSMNCCNATGTAY3' (SEQ ID NO: 41),

1B-5'TCNCTNCAYSMNCCNATGTAY3' (SEQ ID NO: 42),

1C-5'AGYTTRCAYSMNCCNATGTAY3' (SEQ ID NO: 43),

1D-5'TCNTTRCAYSMNCCNATGTAY3' (SEQ ID NO: 44);

(2) para AMAFDY: 2A-5'GCNATGGCNTTYGAYCGNTAY3' (SEQ ID NO: 45),

2B-5'GCNATGGCNTTYGAYAGRTAY3' (SEQ ID NO: 46);

(3) para YVAICHP: 3A-5'TAYGTNGCNATHGTGYCAYCCN3' (com sentido) (SEQ ID NO: 47),

3B-5'NGGRTGRCADATNGCNACRTA3' (anti-sentido) (SEQ ID NO: 48);

(4) para KAFGTCV: 4A-5'NACRCANGTNCCRAANGCYTT3' (anti-sentido) (SEQ ID NO: 49);

(5) para GVKTKEI: 5A-5'DATYTSYTTNGTYTTNRCNCC3' (anti-sentido) (SEQ ID NO: 50);

em que (A) representa adenina, (C) citosina, (G) guanina, (T) timina, (R) adenina ou guanina, (Y) citosina ou timina, (S) citosina ou guanina, (D) adenina ou guanina ou timina, (H) adenina ou citosina ou timina, (N) adenina ou guanina ou citosina ou timina.

A combinação de iniciadores é utilizada para amplificar membros da família a partir da primeira cadeia de cDNA: mistura de 1A-1D & 3B; mistura de 1A-1D & 4A;

mistura de 1A-1D & 5A; mistura de 2A+2B & 4A; mistura de 2A+2B & 5A; 3A & 4A; 3A & 5A. Os produtos de PCR resultantes são então ligados no vector PCR2.1 (Invitrogen) e subsequentemente transformado em *E. coli* DH5. Após selecção azul/branco e selecção com ampicilina em agar, as colónias brancas resistentes a ampicilina são expandidas em cultura líquida para purificação de plasmídeo e sequenciação de inserções de cDNA. As sequências destes clones são comparadas cpm a sequência de PHOR-1 e pesquisadas contra bases de dados públicas e privadas. As sequências que representam novos membros da família PHOR-1 são retirados para análise posterior e clonagem do tamanho completo.

Ao longo deste pedido, são referenciadas várias publicações. As revelações destas publicações são aqui incorporadas por referência na sua totalidade.

A presente invenção não está limitada no seu âmbito pelas formas de realização aqui reveladas, que se pretendem como ilustrações simples de aspectos de individuais da invenção, e quaisquer que sejam funcionalmente equivalentes no âmbito da invenção. Várias modificações dos modelos e métodos da invenção, em adição às aqui descritas, tornar-se-ão evidentes aos especialistas da técnica a partir da descrição e revelações anteriores, e pretende-se, do mesmo modo, que caiam no âmbito da invenção. Estas modificações ou outras formas de realização podem ser praticadas sem se afastar do verdadeiro âmbito e espírito da invenção.

Applicant's or agent's file reference number	129.24WOU1	International applicant
--	------------	-------------------------

INDICATIONS RELATING TO A DEPOSITED MICROORGANISM

(PCT Rule 136is)

A. The indications made below relate to the microorganism referred to in the description on page 55, line 15-16	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSIT Further deposits are identified on an additional sheet ☐	
Name of depositary institution American Type Culture Collection	
Address of depositary institution (including postal code and country) 10801 University Boulevard Manassas, Virginia 20110-2209 United States of America	
Date of deposit July 2, 1999	Accession Number PTA-312
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet ☐	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable) The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	

For receiving Office use only	For International Bureau use only
☒ This sheet was received with the international application	☐ This sheet was received by the International Bureau on:
Authorized officer: PAUL F. URRUTIA INTERNATIONAL DIVISION 703-305-3681	Authorized officer:

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Arthur B. Raitano
 Daniel E.H.Afar
 Aya Jakobovits
 Mary Faris
 Rene S. Hubert
 Steve Chappell Mitchell
 Douglas C. Saffran

<120> NOVO RECEPTOR DE PROTEÍNA G SOBRE-REGULADO EM CANCRO DA PRÓSTATA
 E SUAS UTILIZAÇÕES

<130> 129.24WOU1

<150> 60/157,902

<151> 1999-10-05

<160> 50

<170> FastSEQ Para Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 3136

<212> DNA

<213> *Homo Sapiens*

<220>

<221> CDS <222> (133)...(1083)

<400> 1

```

cagagagggt gttattcagt gcagcctgcc agacctcttc tggaggaaga ctggacaaag      60
ggggtcacac attccttcca tccgggtgag cctctacctg cctgggtgctg gtcacagttc      120
agcttcttca tg atg gtg gat ccc aat ggc aat gaa tcc agt gct aca tac      171
          Met Val Asp Pro Asn Gly Asn Glu Ser Ser Ala Thr Tyr
              1              5              10

ttc atc cta ata ggc ctc cct ggt tta gaa gag gct cag ttc tgg ttg      219
Phe Ile Leu Ile Gly Leu Pro Gly Leu Glu Glu Ala Gln Phe Trp Leu
      15              20              25

gcc ttc cca ttg tgc tcc ctc tac ctt att gct gtg cta ggt aac ttg      267
Ala Phe Pro Leu Cys Ser Leu Tyr Leu Ile Ala Val Leu Gly Asn Leu
      30              35              40              45

aca atc atc tac att gtg cgg act gag cac agc ctg cat gag ccc atg      315
Thr Ile Ile Tyr Ile Val Arg Thr Glu His Ser Leu His Glu Pro Met
              50              55              60

tat ata ttt ctt tgc atg ctt tca ggc att gac atc ctc atc tcc acc      363
Tyr Ile Phe Leu Cys Met Leu Ser Gly Ile Asp Ile Leu Ile Ser Thr
              65              70              75

tca tcc atg ccc aaa atg ctg gcc atc ttc tgg ttc aat tcc act acc      411
Ser Ser Met Pro Lys Met Leu Ala Ile Phe Trp Phe Asn Ser Thr Thr
              80              85              90

atc cag ttt gat gct tgt ctg cta cag att ttt gcc atc cac tcc tta      459
Ile Gln Phe Asp Ala Cys Leu Leu Gln Ile Phe Ala Ile His Ser Leu
              95              100              105

```

```

tct ggc atg gaa tcc aca gtg ctg ctg gcc atg gct ttt gac cgc tat      507
Ser Gly Met Glu Ser Thr Val Leu Leu Ala Met Ala Phe Asp Arg Tyr
110                      115                      120                      125

gtg gcc atc tgt cac cca ctg cgc cat gcc aca gta ctt acg ttg cct      556
Val Ala Ile Cys His Pro Leu Arg His Ala Thr Val Leu Thr Leu Pro
130                      135                      140

cgt gtc acc aaa att ggt gtg gct gct gtg gtg cgg ggg gct gca ctg      603
Arg Val Thr Lys Ile Gly Val Ala Ala Val Val Arg Gly Ala Ala Leu
145                      150                      155

atg gca ccc ctt cct gtc ttc atc aag cag ctg ccc ttc tgc cgc tcc      651
Met Ala Pro Leu Pro Val Phe Ile Lys Gln Leu Pro Phe Cys Arg Ser
160                      165                      170

aat atc ctt tcc cat tcc tac tgc cta cac caa gat gtc atg aag ctg      699
Asn Ile Leu Ser His Ser Tyr Cys Leu His Gln Asp Val Met Lys Leu
175                      180                      185

gcc tgt gat gat atc cgg gtc aat gtc gtc tat ggc ctt atc gtc atc      747
Ala Cys Asp Asp Ile Arg Val Asn Val Val Tyr Gly Leu Ile Val Ile
190                      195                      200                      205

atc tcc gcc att ggc ctg gac tca ctt ctc atc tcc ttc tca tat ctg      795
Ile Ser Ala Ile Gly Leu Asp Ser Leu Leu Ile Ser Phe Ser Tyr Leu
210                      215                      220

ctt att ctt aag act gtg ctg ggc ttg aca cgt gaa gcc cag gcc aag      843
Leu Ile Leu Lys Thr Val Leu Gly Leu Thr Arg Glu Ala Gln Ala Lys
225                      230                      235

gca ttt ggc act tgc gtc tct cat gtg tgt gct gtg ttc ata ttc tat      891
Ala Phe Gly Thr Cys Val Ser His Val Cys Ala Val Phe Ile Phe Tyr
240                      245                      250

gra cct ttc att gga ttg tcc atg gtg cat cgc ttt agc aag cgg cgt      939
Val Pro Phe Ile Gly Leu Ser Met Val His Arg Phe Ser Lys Arg Arg
255                      260                      265

gac tct ccg ctg ccc gtc atc ttg gcc aat atc tat ctg ctg gtc cct      987
Asp Ser Pro Leu Pro Val Ile Leu Ala Asn Ile Tyr Leu Leu Val Pro
270                      275                      280                      285

cct gtg ctc aac cca att gtc tat ggc gtg aag aca aag gag att cga      1035
Pro Val Leu Asn Pro Ile Val Tyr Gly Val Lys Thr Lys Glu Ile Arg
290                      295                      300

cag cgc atc ctt cga ctt ttc cat gtg gcc aca cac gct tca gag ccc      1083
Gln Arg Ile Leu Arg Leu Phe His Val Ala Thr His Ala Ser Glu Pro
305                      310                      315

taggtgtcag tgatcaaaact tcttttccat tcagagtcct ctgattcaga ttttaagtgt      1143
aacatttttg aagacagtat tcagaaaaaa aatttcccta ataaaaaata caactcagat      1203
ccttcaataa tgaaactggg tgggggaatct ccattttttc aatatttatt tcttcttgt      1263
tttcttgcta catataatta ttaataccct gactagggttg tgggtggagg gttattactt      1323
ttcatttttc catgcagctc aaactcaaac tgcctctact gatgggttac agcattctga      1383
gataagaatc gtacatctag agaacatttg ccaaggccct aagcagggca agggaaaaata      1443
aacacagaat ataataaaat gagataatct agcttaaaac tataactttc tcttcagaac      1503
tcccaaccac attggatctc agaasaatgc tgttttcaaa atgacttcta cagagaagaa      1563
ataatttttc cctcggacac tagcacttaa ggggaagatt ggaagtaaag ccttgaaaag      1623
agtacattta cctaogttaa tgaagttga cacactgttc tgagagtttt cacagcatat      1683
ggaccctgtt ttctctattt aatttcttta tcaccccttt aattaggcaa agatattatt      1743
agtaacctca ttgtagccat gggaaaattg atgttcagtg gggatcagtg aattaaatgg      1803

```

```

gggcatacaaa gtataaaaat taaaaaaa aaagacttca tgcccaatct catatgatgt 1863
gggaagaactg ttagagagag caacagggta gtgggttaga gatttccaga gtcttacatt 1923
ttctagagga ggtatttaat ttcttctcac tcatccagtg ttgtatttag gaatttctcg 1983
gcaacagaaac tcatgggttt aatcccacta gctattgctt attgtccctgg tccaattgco 2043
aatlacctgt gtcttggaa gagtgaattc taggttcacc attatggaag attcttattc 2103
agaaggtctg catagggctt atagcaagtc attattttt aaaagttcca taggtgattc 2163
tgataggtag tgaggttagg gagccaccag tcatgatggg aagtatggaa tggcaggtct 2223
tgaagataac attggccttc tgagttgtag tctagctgg aaagtgaagg aatcttcagg 2283
accatgcttt attggggct ttgtgcagta tgggaacggg accttgagac caggaaagca 2343
atctgactta ggcattggaa tcaggcattt ttgctcttga ggggctatta ccaagggcta 2403
atagggttca tctcaacag gatatgacaa cagtgttaac caagaaactc aaattacaaa 2463
tactaaaaa tgatgcata tatgttgtaa gtttcatttt cttttcaat cctcaggttc 2523
cctgatatgg attcctataa catgctttca tccccctttg taatggatat catatttggg 2583
aatgctcttt taatacttgt atttgctgct ggactgttaag cccatgaggg cactgtttat 2643
tattgaargt catctctgtt catcattgac tgcctcttgc tcatcattga atcccccagc 2703
aaagtgccta gaacataata gtgcttatgc ttgacacggg ttatttttca tcaaacctga 2763
ttccttctgt cctgaacaca tagccaggca attttccagc ctctcttgag ttgggtatta 2823
ttaaattctg gccattactt ccaatgtgag tggaaagtga atgtgcaatt tctatacctg 2883
gtccataaaa cctcccatg tgcagccttt catgttgaca ttaaatgtga ctggggaagc 2943
taagtgttac acagaytaaa tcaccagaag cctggatttc tgaaaaaact gtgcagagcc 3003
aaacctctgt catttgcaac tcccacttgt atttgtacga ggcagttgga taagtgaaaa 3063
ataaagtact attgtgtcaa gaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa aaaaaaaa 3123
aaaaaaaa aaa 3186

```

<210> 2

<211> 317

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 2

```

Met Val Asp Pro Asn Gly Asn Glu Ser Ser Ala Thr Tyr Phe Ile Leu
1      5      10      15
Ile Gly Leu Pro Gly Leu Glu Glu Ala Gln Phe Trp Leu Ala Phe Pro
20     25     30
Leu Cys Ser Leu Tyr Leu Ile Ala Val Leu Gly Asn Leu Thr Ile Ile
35     40     45
Tyr Ile Val Arg Thr Glu His Ser Leu His Glu Pro Met Tyr Ile Phe
50     55     60
Leu Cys Met Leu Ser Gly Ile Asp Ile Leu Ile Ser Thr Ser Ser Met
65     70     75     80
Pro Lys Met Leu Ala Ile Phe Trp Phe Asn Ser Thr Thr Ile Gln Phe
85     90     95
Asp Ala Cys Leu Leu Gln Ile Phe Ala Ile His Ser Leu Ser Gly Met
100    105    110
Glu Ser Thr Val Leu Leu Ala Met Ala Phe Asp Arg Tyr Val Ala Ile
115    120    125
Cys His Pro Leu Arg His Ala Thr Val Leu Thr Leu Pro Arg Val Thr
130    135    140
Lys Ile Gly Val Ala Ala Val Val Arg Gly Ala Ala Leu Met Ala Pro
145    150    155    160
Leu Pro Val Phe Ile Lys Gln Leu Pro Phe Cys Arg Ser Asn Ile Leu
165    170    175
Ser His Ser Tyr Cys Leu His Gln Asp Val Met Lys Leu Ala Cys Asp
180    185    190
Asp Ile Arg Val Asn Val Val Tyr Gly Leu Ile Val Ile Ser Ala
195    200    205
Ile Gly Leu Asp Ser Leu Leu Ile Ser Phe Ser Tyr Leu Leu Ile Leu
210    215    220
Lys Thr Val Leu Gly Leu Thr Arg Glu Ala Gln Ala Lys Ala Phe Gly
225    230    235    240
Thr Cys Val Ser His Val Cys Ala Val Phe Ile Phe Tyr Val Pro Phe
245    250    255
Ile Gly Leu Ser Met Val His Arg Phe Ser Lys Arg Arg Asp Ser Pro
260    265    270

```

PE1220913

- 159 -

<210> 3
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> Proteína de Rato
 <400> 3

```

Met Ser Ser Cys Asn Phe Thr His Ala Thr Phe Met Leu Ile Gly Ile
 1          5          10          15
Pro Gly Leu Glu Glu Ala His Phe Trp Phe Gly Phe Pro Leu Leu Ser
      20          25          30
Met Tyr Ala Val Ala Leu Phe Gly Asn Cys Ile Val Val Phe Ile Val
      35          40          45
Arg Thr Glu Arg Ser Leu His Ala Pro Met Tyr Leu Phe Leu Cys Met
      50          55          60
Leu Ala Ala Ile Asp Leu Ala Leu Ser Thr Ser Thr Met Pro Lys Ile
      65          70          75          80
Leu Ala Leu Phe Trp Phe Asp Ser Arg Glu Ile Thr Phe Asp Ala Cys
      85          90          95
Leu Ala Gln Met Phe Phe Ile His Ala Leu Ser Ala Ile Glu Ser Thr
      100         105         110
Ile Leu Leu Ala Met Ala Phe Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys His Pro
      115         120         125
Leu Arg His Ala Ala Val Leu Asn Asn Thr Val Thr Val Gln Ile Gly
      130         135         140
Met Val Ala Leu Val Arg Gly Ser Leu Phe Phe Phe Pro Leu Pro Leu
      145         150         155         160
Leu Ile Lys Arg Leu Ala Phe Cys His Ser Asn Val Leu Ser His Ser
      165         170         175
Tyr Cys Val His Gln Asp Val Met Lys Leu Ala Tyr Thr Asp Thr Leu
      180         185         190
Pro Asn Val Val Tyr Gly Leu Thr Ala Ile Leu Leu Val Met Gly Val
      195         200         205
Asp Val Met Phe Ile Ser Leu Ser Tyr Phe Leu Ile Ile Arg Ala Val
      210         215         220
Leu Gln Leu Pro Ser Lys Ser Glu Arg Ala Lys Ala Phe Gly Thr Cys
      225         230         235         240
Val Ser His Ile Gly Val Val Leu Ala Phe Tyr Val Pro Leu Ile Gly
      245         250         255
Leu Ser Val Val His Arg Phe Gly Asn Ser Leu Asp Pro Ile Val His
      260         265         270
Val Leu Met Gly Asp Val Tyr Leu Leu Leu Pro Pro Val Ile Asn Pro
      275         280         285
Ile Ile Tyr Gly Ala Lys Thr Lys Gln Ile Arg Thr Arg Val Leu Ala
      290         295         300
Met Phe Lys Ile Ser Cys Asp Lys Asp Ile Glu Ala Gly Gly Asn Thr
      305         310         315         320

```

<210> 4
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

<400> 4

```

Met Ser Ser Cys Asn Phe Thr His Ala Thr Cys Val Leu Ile Gly Ile
 1          5          10          15
Pro Gly Leu Glu Lys Ala His Phe Trp Val Gly Phe Pro Leu Leu Ser
      20          25          30

```

```

Met Tyr Val Val Ala Met Cys Gly Asn Cys Ile Val Val Phe Ile Val
  35          40          45
Arg Thr Glu Arg Ser Leu His Ala Pro Met Tyr Leu Phe Leu Cys Met
  50          55          60
Leu Ala Ala Ile Asp Leu Ala Leu Ser Thr Ser Thr Met Pro Lys Ile
  65          70          75          80
Leu Ala Leu Phe Trp Phe Asp Ser Arg Glu Ile Ser Ile Glu Ala Cys
  85          90          95
Leu Thr Gln Met Phe Phe Ile His Ala Leu Ser Ala Ile Glu Ser Thr
 100          105          110
Ile Leu Leu Ala Met Ala Phe Asp Arg Tyr Val Ala Ile Cys His Pro
 115          120          125
Leu Arg His Ala Ala Val Leu Asn Asn Thr Val Thr Ala Gln Ile Gly
 130          135          140
Ile Val Ala Val Val Arg Gly Ser Leu Phe Phe Phe Pro Leu Pro Leu
 145          150          155          160
Leu Ile Lys Arg Leu Ala Phe Cys His Ser Asn Val Leu Ser His Ser
 165          170          175
Tyr Cys Val His Gln Asp Val Met Lys Leu Ala Tyr Ala Asp Thr Leu
 180          185          190
Pro Asn Val Val Tyr Gly Leu Thr Ala Ile Leu Leu Val Met Gly Val
 195          200          205
Asp Val Met Phe Ile Ser Leu Ser Tyr Phe Leu Ile Ile Arg Thr Val
 210          215          220
Leu Gln Leu Pro Ser Lys Ser Glu Arg Ala Lys Ala Phe Gly Thr Cys
 225          230          235          240
Val Ser His Ile Gly Val Val Leu Ala Phe Tyr Val Pro Leu Ile Gly
 245          250          255
Leu Ser Val Val His Arg Phe Gly Asn Ser Leu His Pro Ile Val Arg
 260          265          270
Val Val Met Gly Asp Ile Tyr Leu Leu Leu Pro Pro Val Ile Asn Pro
 275          280          285
Ile Ile Tyr Gly Ala Lys Thr Lys Gln Ile Arg Thr Arg Val Leu Ala
 290          295          300
Met Phe Lys Ile Ser Cys Asp Lys Asp Leu Gln Ala Val Gly Gly Lys
 305          310          315          320

```

<210> 5

<211> 427

<212> DNA

<213> *Homo Sapiens*

<400> 5

```

gatcaaacct cttttccatt cagagtcctc tgatttcagat cttaattgta acattttgga      60
ggacagtatt cagaaaaaaa atttccctta taaaaataca actcagatcc ttcaaatatg      120
aaactgggttg ggaattctcc atttttcaa tattattttc ttctttggtt tcttgctacg      180
tataattatt aatatcctga ctaggttgtg gttggagggt tattactttt catcttacca      240
tgcagtccaa atctaaactg ctctactga tggtttacag cattctgaga taagaatggt      300
acatctagag aacatttgcc aaaggcctaa gcacagcaaa ggaataaaa cacagaatat      360
ataaaaatga gataatctag cttaaaaacta taacttcttc tttagaactc ccaaccacat      420
ttggatc

```

427

<210> 6

<211> 501

<212> DNA

<213> *Homo Sapiens*

<220>

<221> CDS <222> (1)...(501)

<400> 6

```

gcc gtg gcc atg ttt att gga gtg ttg gat cta ttc ttt atc atc cta
Ala Val Ala Met Phe Ile Gly Val Leu Asp Leu Phe Phe Ile Ile Leu

```

48

1	5	10	15	
tct tat atc ttt atc ctt cag gca gtt cta caa ctc tcc tct cag gag				96
Ser Tyr Ile Phe Ile Leu Gln Ala Val Leu Gln Leu Ser Ser Gln Glu	20	25	30	
gcc cgc tac aaa gca ttt ggg aca tgt gtc tct cac ata ggt gcc atc				144
Ala Arg Tyr Iys Ala Phe Gly Thr Cys Val Ser His Ile Gly Ala Ile	35	40	45	
tta gcc ttc tac aca cct tca gtc atc tct tca gtc atg cac cgt gtg				192
Leu Ala Phe Tyr Thr Pro Ser Val Ile Ser Ser Val Met His Arg Val	50	55	60	
gcc cgc tgt gct gtg cca cac gtc cac att ctc ctc gcc aat ttc tat				240
Ala Arg Cys Ala Val Pro His Val His Ile Leu Leu Ala Asn Phe Tyr	65	70	75	80
ctg ctc ttc cca ccc atg gtc aat ccc atc atc tat gcc gtt aag acc				288
Leu Leu Phe Pro Pro Met Val Asn Pro Ile Ile Tyr Gly Val Lys Thr	85	90	95	
aag cag atc cgt gac agt ctt ggg agt att cct gag aaa gga tgt gtg				336
Iys Gln Ile Arg Asp Ser Leu Gly Ser Ile Pro Glu Lys Gly Cys Val	100	105	110	
aat aga gag tga gga ata agt gga aaa aga gtg ggg ccc agt gaa tgc				384
Asn Arg Glu * Gly Ile Ser Gly Lys Arg Val Gly Pro Ser Glu Cys	115	120	125	
tgt agt ggg cca ggg ctg tgc tga gag tag atg ggt cct aga ctc cac				432
Cys Ser Gly Pro Gly Leu Cys * Glu * Met Gly Pro Arg Leu His	130	135	140	
gtt tag ttc ttt tct tgt att atg aaa aga ata aat gat gtc ctg aag				480
Val * Phe Phe Ser Cys Ile Met Lys Arg Ile Asn Asp Val Leu Lys	145	150	155	
ctc aga aaa aaa aaa aaa aaa				501
Leu Arg Lys Lys Lys Lys Lys	160			

<210> 7

<211> 163

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 7

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

```

      115      120      125
Ser Gly Pro Gly Leu Cys Glu Met Gly Pro Arg Leu His Val Phe Phe
      130      135      140
Ser Cys Ile Met Lys Arg Ile Asn Asp Val Leu Lys Leu Arg Lys Lys
      145      150      155      160
Lys Lys Lys

```

<210> 8
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

```

<400> 8
      Met Val Asp Pro Asn Gly Asn Glu Ser Ser Ala Thr Tyr Phe
      1              5              10

```

<210> 9
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

```

<400> 9
      Val His Arg Phe Ser Lys Arg Arg Asp Ser Pro Leu Pro
      1              5              10

```

<210> 10
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

```

<400> 10
      Asn Glu Ser Ser
      1

```

<210> 11
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

```

<400> 11
      Asn Leu Thr Ile
      1

```

<210> 12
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

```

<400> 12
      Asn Ser Thr Thr
      1

```

<210> 13
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*

<400> 13

Arg Arg Asp Ser
1

<210> 14
<211> 4
<212> PRT
<213> *Homo Sapiens*

<400> 14
Ser Leu His Glu
1

<210> 15
<211> 4
<212> PRT
<213> *Homo Sapiens*

<400> 15
Ser Gly Ile Asp
1

<210> 16
<211> 4
<212> PRT
<213> *Homo Sapiens*

<400> 16
Ser Gly Met Glu
1

<210> 17
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo Sapiens*

<400> 17
Gly Asn Glu Ser Ser Ala
1 5

<210> 18
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo Sapiens*

<400> 18
Gly Leu Glu Glu Ala Gln
1 5

<210> 19
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo Sapiens*

<400> 19

Gly Met Glu Ser Thr Val
1 5

<210> 20
<211> 6
<212> PRT
<213> *Homo Sapiens*

<400> 20
Gly Thr Cys Val Ser His
1 5

<210> 21
<211> 14
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 21
tttgatcaa gctt 14

<210> 22
<211> 42
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 22
ctaatacgac tcactatagg gctcgagcgg ccgccccggc ag 42

<210> 23
<211> 12
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 23
ggccccctct ag 12

<210> 24
<211> 40
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 24

gtaatacgac tcactatagg gcagcgtggt cgcggccgag 40

<210> 25
<211> 10
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 25
cggctcctag 10

<210> 26
<211> 22
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 26
ctaatacgac tcactatagg gc 22

<210> 27
<211> 22
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 27
tcgagcggcc gcccgggcag ga 22

<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 28
agcgtgggtcg cggccgagga 20

<210> 29
<211> 25
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador

<400> 29

atatcgccgc gctcgtcgtc gacaa 25

<210> 30

<211> 26

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 30

agccacacgc agctcattgt agaagg 26

<210> 31

<211> 24

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 31

atcctgacta ggttggtgtt ggag 24

<210> 32

<211> 24

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 32

tggtgtggg agttctaaag agga 24

<210> 33

<211> 24

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> FLAG tag

<400> 33

gattacaagg atgacgacga taag 24

<210> 34

<211> 27

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 34

ccgaattcca tctctgggt caatttc 27

<210> 35

<211> 29

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<400> 35

ccctctcgagt tcacatggaa aagtcgaag 29

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 36

Ser	Leu	His	Glu	Pro	Met	Tyr
1				5		

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 37

Ala	Met	Ala	Phe	Asp	Arg	Tyr
1				5		

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 38

Tyr	Val	Ala	Ile	Cys	His	Pro
1				5		

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 39

Lys	Ala	Phe	Gly	Thr	Cys	Val
1				5		

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo Sapiens*

<400> 40

Gly Val Lys Thr Lys Glu Ile
1 5

<210> 41

<211> 21

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<221> característica_misc

<222> (1)...(21)

<223> n = A, T, C ou G

<400> 41

agycncays mncnagta y 21

<210> 42

<211> 21

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<221> característica_misc

<222> (1)...(21)

<223> n = A, T, C ou G

<400> 42

tcnctncays mncnagta y 21

<210> 43

<211> 21

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<221> característica_misc

<222> (1)...(21)

<223> n = A, T, C ou G

<400> 43

agyttrcays mncnagta y 21

<210> 44

<211> 21

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Iniciador

<221> característica_misc

<222> (1)...(21)
<223> n = A, T, C ou G

<400> 44
tcntrcays mncnctgt y 21

<210> 45
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador
<221> característica_misc
<222> (1)...(21)
<223> n = A, T, C ou G

<400> 45
gcnatggcnt tygaycgnta y 21

<210> 46
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador
<221> característica_misc
<222> (1)...(21)
<223> n = A, T, C ou G

<400> 46
gcnatggcnt tygayagnta y 21

<210> 47
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador
<221> característica_misc
<222> (1)...(21)
<223> n = A, T, C ou G

<400> 47
taygtngcna thtgaycc n 21

<210> 48
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador
<221> característica_misc
<222> (1)..(21)
<223> n = A, T, C ou G

<400> 48
nggrtgcad atngcnact a 21
<210> 49
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador
<221> característica_misc
<222> (1)...(21)
<223> n = A, T, C ou G

<400> 49
nacrcangtn ccrsangcyt t 21

<210> 50
<211> 21
<212> DNA
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> Iniciador
<221> característica_misc
<222> (1)...(21)
<223> n = A, T, C ou G

<400> 50
datytsytn gtytnrcnc c 21

Lisboa, 5 de Fevereiro de 2009

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de um polipéptido codificado por um polinucleótido seleccionado a partir do grupo consistindo em:

- a) um polinucleótido de SEQ ID NO:1:
- b) um polinucleótido de SEQ ID NO:1 do resíduo de nucleótido número 133 ao resíduo de nucleótido número 1083; e
- c) o polinucleótido contido no plasmídeo designado P101P3A11 depositado no American Type Culture Collection com o número de Acesso: PTA-312; como um marcador para a próstata, rim, uterino, cervical, estômago e cancro rectal.

2. Utilização da reivindicação 1, em que o cancro é cancro da próstata.

3. Utilização de um anticorpo ou um seu fragmento que se liga especificamente ao polipéptido de SEQ ID NO:2 na preparação de um medicamento para o tratamento de cancro da próstata, rim, uterino, cervical, estômago ou rectal.

4. Utilização da reivindicação 3, em que o

anticorpo ou fragmento é conjugado com uma toxina ou um agente terapêutico.

5. Utilização de um anticorpo ou um seu fragmento que se liga especificamente ao polipéptido de SEQ ID NO:2 num método para detectar cancro da próstata, rim, uterino, cervical, estômago ou rectal.

6. Utilização da reivindicação 5, em que o anticorpo ou fragmento é marcado com um marcador detectável.

7. Utilização de qualquer das reivindicações 3-6, em que o anticorpo ou fragmento é monoclonal.

8. Utilização de qualquer das reivindicações 3-6, em que o fragmento é um Fab, F(ab')₂, Fv ou fragmento sFv.

9. Utilização de qualquer das reivindicações 3-6, em que o anticorpo é um anticorpo humano ou compreende região de resíduos de ligação a murino e resíduos de anticorpo humano.

10. Utilização de qualquer das reivindicações 3-6 em que o referido anticorpo é a anticorpo monoclonal de cadeia simples que compreende os domínios variáveis das cadeias pesada e leve.

11. Utilização de um vector compreendendo um

polinucleótido que codifica um anticorpo monoclonal ou fragmento específico para o péptido de SEQ ID NO:2 na preparação de um medicamento para o tratamento de cancro da próstata, rim, uterino, cervical, estômago ou rectal.

12. Utilização de qualquer das reivindicações 5-9, em que o referido método compreende o contacto da amostra com um anticorpo ou fragmento que se liga especificamente ao polipéptido de SEQ ID NO:2, e detecção da ligação de qualquer das referidas proteínas nessa amostra, em que a presença da ligação indica a presença do referido cancro.

Lisboa, 5 de Fevereiro de 2009

FIG. 1A

		9		18		27		36		45		54						
5'	CAG	AGA	GGC	TGT	ATT	TCA	GTG	CAG	ECT	GCC	AGA	CCT	CTT	CTG	GAG	GAA	GAC	TGG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		63		72		81		90		99		108						
	ACA	AAG	GGG	GTG	ACA	CAT	TCC	TTC	CAT	ACG	GTT	GAG	CCT	CTA	CCT	GCC	TGG	TGC
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		117		126		135		144		153		162						
	TGG	TCA	CAG	TTG	AGC	TTC	TTC	ATG	ATG	GTG	GAT	CCC	AAT	GGC	AAT	GAA	TCC	AGT
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
						M	M	V	D	P	N	G	N	E	S	S		
		171		180		189		198		207		216						
	GCT	ACA	TAC	TTC	ATC	CTA	ATA	GGC	CTC	CCT	GCT	TTA	GAA	GAG	GCT	CAG	TTC	TGG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	A	T	Y	F	I	L	I	G	L	P	G	L	E	E	A	Q	F	W
		225		234		243		252		261		270						
	TTG	GCC	TTC	CCA	TTG	TGC	TCC	CTC	TAC	CTT	ATT	GCT	GTG	CTA	GGT	AAC	TTG	ACA
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	L	A	F	P	L	C	S	L	V	L	I	A	V	L	G	N	L	T
		279		288		297		306		315		324						
	ATC	ATC	TAC	ATT	GTG	CGG	ACT	GAG	CAC	AGC	CTG	CAT	GAG	CCC	ATG	TAT	ATA	TTT
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	I	I	Y	I	V	R	T	E	H	S	L	H	E	P	M	Y	L	R
		333		342		351		360		369		378						
	CTT	TGC	ATG	CTT	TCA	GGC	ATT	GAC	ATC	CTC	ATC	TCC	ACC	TCA	TCC	ATG	CCC	AAA
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	L	C	M	L	S	S	I	D	I	L	I	S	T	S	S	M	P	N
		387		396		405		414		423		432						
	ATG	CTG	GCC	ATC	TTC	TGG	TTC	AAT	TCC	ACT	ACC	ATC	CAG	TTT	GAT	GCT	TGT	CTG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	M	L	A	I	P	W	F	N	S	T	T	I	Q	F	D	A	C	L
		441		450		459		468		477		486						
	CTA	CAG	ATT	TTT	GCC	ATC	CAC	TCC	TTA	TCT	GGC	ATG	GAA	TCC	ACA	GTG	CTG	CTG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	L	Q	I	F	A	I	H	S	L	S	G	M	E	S	T	V	L	R
		495		504		513		522		531		540						
	GCC	ATG	GCT	TTT	GAC	CGC	TAT	GTG	GCC	ATC	TGT	CAC	CCA	CTG	CGC	CAT	GCC	ACA
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	A	M	A	F	D	R	Y	V	A	I	C	H	P	L	R	H	A	H
		549		558		567		576		585		594						
	GTA	CTT	ACG	TTG	CCT	CGT	CTC	ACC	AAA	ATT	GGT	GTG	GCT	GCT	GTG	GTG	CGG	GGG
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	V	L	T	L	F	R	V	T	K	I	G	V	A	A	V	V	R	S

FIG. 1B

503	612	621	630	639	648
GCT GCA CTG ATG	GCA CCC CTT CCT	GTC TTC ATC AAG	CAG CTG CCC TTC	TGC CGC	
A A L M	A P L P	V F I K	Q L P F	C R	
657	666	675	684	693	702
TCC AAT ATC CTT	TCC CAT TCC TAC	TGC CTA CAC CAA	GAT GTC ATG AAG	CTG GCC	
S N I L	S H S Y	C L H Q	D V M K	L A	
711	720	729	738	747	756
TGT GAT GAT ATC	CGG GTC AAT GTC	GTC TAT GGC CTT	ATC GTC ATC ATC	TCC GCC	
C D D I	R V N V	V Y G L	I V I I	S A	
765	774	783	792	801	810
ATT GGC CTG GAC	TCA CTT CTC ATC	TCC TTC TCA TAT	CTG CTT ATT CTT	AAG ACT	
I G L D	S L L I	S P S Y	L L I L	K T	
819	828	837	846	855	864
GTG TTG GGC TTG	ACA CGT GAA GCC	CAG GGC AAG GCA	TTT GGC ACT TGC	GTC TCT	
V L G L	T R E A	Q A K A	F G T C	V S	
873	882	891	900	909	918
CAT GTG TGT GCT	GTG TTC ATA TTC	TAT GTA CCT TTC	ATT GGA TTG TCC	ATG GTG	
R V C A	V F I F	Y V P F	I G L S	M V	
927	936	945	954	963	972
CAT CGC TTT AGC	AAG CGG CCG	GAC TCT CCG	CTG CCC GTC	ATC TTG	GCC AAT ATC
R R F S	K R R D	S P	L P V I	L A N I	
981	990	999	1008	1017	1026
TAT CTG CTG GTT	CCT CCT GTG	CTC AAC CCA	ATT GTC TAT	GGA GTG	AAG ACA AAG
Y L L V	P P V L	N P I V	Y G V	K T K	
1035	1044	1053	1062	1071	1080
GAG ATT CGA CAG	CGC ATC CTT CGA	CTT TTC CAT	GTG GCC ACA	CAC GCT	TCA GAG
E I R Q	R I L R	L F H V	A T H A	S E	
1089	1098	1107	1116	1125	1134
CCC TAG GTG TCA	GTG ATC AAA CTT	CTT TTC CAT	TCA GAG TCC	TCT GAT	TCA GAT
P *					
1143	1152	1161	1170	1179	1188
TIT AAT GTT AAC	ATT TTG GAA GAC	AGT ATT CAG	AAA AAA AAT	TTC CTT	AAT AAA

FIG. 1C

1197	1206	1215	1224	1233	1242
AAA TAC AAC TCA GAT CCT TCA AAT ATG AAA CTG GTT GGG GAA TCT CCA TTT TTT					
1251	1260	1269	1278	1287	1296
CAA TAT TAT TTT CTT CTT TGT TTT CTT GCT ACA TAT AAT TAT TAA TAC CCT GAC					
1305	1314	1323	1332	1341	1350
TAG GTT GTG GTT GGA GGG TTA TTA CTT TTC ATT TTA CCA TGC AGT CCA AAT CTA					
1359	1368	1377	1386	1395	1404
AAC TGC TTC TAC TGA TGG TTT ACA GCA TTC TGA GAT AAG AAT GGT ACA TCT AGA					
1413	1422	1431	1440	1449	1458
GAA CAT TTG CCA AAG GCC TAA GCA CGG CAA AGG AAA ATA AAC ACA GAA TAT AAT					
1467	1476	1485	1494	1503	1512
AAA ATG AGA TAA TCT AGC TTA AAA CTA TAA CTT CCT CTT CAG AAC TCC CAA CCA					
1521	1530	1539	1548	1557	1566
CAT TGG ATC TCA GAA AAA TGC TGT CTT CAA AAT GAC TTC TAC AGA GAA GAA ATA					
1575	1584	1593	1602	1611	1620
ATT TTT CCT CTG GAC ACT AGC ACT TAA GGG GAA GAT TGG AAG TAA AGC CTT GAA					
1629	1638	1647	1656	1665	1674
AAG AGT ACA TTT ACC TAC GTT AAT GAA AGT TGA CAC ACT GTT CTG AGA GTT TTC					
1683	1692	1701	1710	1719	1728
ACA GCA TAT GGA CCC TGT TTT TCC TAT TTA ATT TTC TTA TCA ACC CTT TAA TTA					
1737	1746	1755	1764	1773	1782
GGC AAA GAT ATT ATT AGT ACC CTC ATT GTA GCC ATG GGA AAA TTG ATG TTC AGT					
1791	1800	1809	1818	1827	1836
GGG GAT CAG TGA ATT AAA TGG GGT CAT ACA AGT ATA AAA ATT AAA AAA AAA AAA					
1845	1854	1863	1872	1881	1890
GAC TTC ATG CCC AAT CTC ATA TGA TGT GCA AGA ACT GTT AGA GAG ACC AAC AGG					
1899	1908	1917	1926	1935	1944
GTA GTG GGT TAG AGA TTT CCA GAG TCT TAC ATT TTC TAG AGG AGG TAT TTA ATT					
1953	1962	1971	1980	1989	1998
TCT TCT CAC TCA TCC AGT GTT GTA TTT AGG AAT TTC CTG GCA ACA GAA CTC ATG					
2007	2016	2025	2034	2043	2052
GCT TTA ATC CCA CTA GCT ATT GCT TAT TGT CCT GGT CCA ATT GCC AAT TAC CTG					
2061	2070	2079	2088	2097	2106
TGT CTT GGA AGA AGT GAT TTC TAG GTT CAC CAT TAT GGA AGA TTC TTA TTC AGA					
2115	2124	2133	2142	2151	2160
AAG TCT GCA TAG GGC TTA TAG CAA GTT ATT TAT TTT TAA AAG TTC CAT AGG TGA					

FIG. 1D

```

      2169      2178      2187      2196      2205      2214
TTC TGA TAG GCA GTG AGG TTA GGG AGC CAC CAG TTA TGA TGG GAA GTA TGG AAT
---
      2223      2232      2241      2250      2259      2268
GGC AGG TCT TGA AGA TAA CAT TGG CCT TTT GAG TGT GAC TCG TAG CTG GAA AGT
---
      2277      2286      2295      2304      2313      2322
GAG GGA ATC TTC AGG ACC ATG CTT TAT TTG GGG CTT TGT GCA GTA TGG AAC AGC
---
      2331      2340      2349      2358      2367      2376
GAC TTT GAG ACC AGG AAA GCA ATC TGA CTT AGG CAT GGG AAT CAG GCA TTT TTC
---
      2385      2394      2403      2412      2421      2430
CTT CTG AGG GGC TAT TAC CAA GGG TTA ATA GGT TTC ATC TTC AAC AGG ATA TGT
---
      2439      2448      2457      2466      2475      2484
CAA CAG TGT TAA CCA AGA AAC TCA AAT TAC AAA TAC TAA AAC ATG TGA TCA TAT
---
      2493      2502      2511      2520      2529      2538
ATG TGG TAA GTT TCA TTT TCT TTT TCA ATC CTC AGG TTC CCT GAT ATG GAT TCC
---
      2547      2556      2565      2574      2583      2592
TAT AAC ATG CTT TCA TCC CCT TTT GTA ATG GAT ATC ATA TTT GGA AAT GCC TAT
---
      2601      2610      2619      2628      2637      2646
TTA ATA CTT GTA TTT GCT GCT GGA CTG TAA GCC CAT GAG GGC ACT GTT TAT TAT
---
      2655      2664      2673      2682      2691      2700
TGA ATG TCA TCT CTG TTC ATC ATT GAC TGC TCT TTG CTC ATC ATT GAA TCC CCC
---
      2709      2718      2727      2736      2745      2754
AGC AAA GTG CCT AGA ACA TAA TAG TGC TTA TGC TTG ACA CCG GTT ATT TTT CAT
---
      2763      2772      2781      2790      2799      2808
CAA ACC TGA TTC CTT CTG TCC TGA ACA CAT AGC CAG GCA ATT TTC CAG CCT TCT
---
      2817      2826      2835      2844      2853      2862
TTG AGT TGG GTA TTA TTA AAT TCT GGC CAT TAC TTC CAA TGT GAG TGG AAG TGA
---
      2871      2880      2889      2898      2907      2916
CAT GTG CAA TTT CTA TAC CTG GCT CAT AAA ACC CTC CCA TGT GCA GCC TTT CAT
---
      2925      2934      2943      2952      2961      2970
GTT GAC ATT AAA TGT GAC TTG GGA AGC TAT GTG TTA CAC AGA GTA AAT CAC CAG
---
      2979      2988      2997      3006      3015      3024
AAG CCT GGA TTT CTG AAA AAA CTG TGC AGA GCC AAA CCT CTG TCA TTT GCA ACT
---
      3033      3042      3051      3060      3069      3078
CCC ACT TGT ATT TGT ACG AGG CAG TTG GAT AAG TGA AAA ATA AAG TAC TAT TGT
---
      3087      3096      3105      3114      3123      3132
GTC AAG AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA
---

```

AAA A 3'

FIG. 2

1	25 16	30 31	45 46	60 61	75 76	90	
1	101PJA11	MWYDPMNBSATYF	ILIGLGLGEEAQMW	APPLCSLXLIAVLGN	LTIIYIVTERSLNE	PMYFLCMLSGDIL	ISTSNPMEHAIEMF
2	2A1C	-MSCH---PTHATF	MLIGLGLGEEAHMF	GRPLSMYAVAFGN	CIYVFIYTERSLNA	PMYFLCMLAIDLA	LSSTMPKILALPMF
3	HPRAJ70	-MSCH---PTHATC	VLIGIPOLEECHANFV	GFPLSMYVAVANGN	CIYVFIYTERSLNA	PMYFLCMLAIDLA	LSSTMPKILALPMF
							90
							56
							86
	91	105 106	120 121	135 136	150 151	165 166	180
1	101PJA11	NSTTIQDACLQIF	AHSLSGNESTVLLA	MAFYVVAICHPLRH	AFVLTLPRTKIGVA	AVVRSALMAQLPVE	IKQLPCCRNLILSHS
2	2A1C	DSEIITFDACLQMF	FINHLSAIESTILLA	MAFYVVAICHPLRH	AAVLTNTVTVIGIMV	ALVRGSLFFFLPLL	IKRLAFCHSNVLSHS
3	HPRAJ70	DSEIISIEACTQMF	FINHLSAIESTILLA	MAFYVVAICHPLRH	AAVLTNTVTVIGIIV	AVVRSALFFFLPLL	IKRLAFCHSNVLSHS
							176
	181	195 196	210 211	225 226	240 241	255 256	270
1	101PJA11	YCLHQDVMKLACDDI	RUVVYGLIIVISAI	QDESLAIEPSKLLIL	KTUIGLTF-REAOADA	FGTCVSHVCNFIYF	VPFIQLSMVHPYSKZ
2	2A1C	YCVHQDVNKLAYTUT	LEHVYVGLTALILVM	QVDMFISLSYFLII	KAVLQLPSKSERAKA	FGTCVSHVGLAPY	VPFIQLSMVHPYSKZ
3	HPRAJ70	YCVHQDVNKLAYAUT	LEHVYVGLTALILVM	QVDMFISLSYFLII	KTUQLPSKSERAKA	FGTCVSHVGLAPY	VPFIQLSMVHPYSKZ
							266
	271	285 286	300 301	315 316	330 331	345 346	360
1	101PJA11	RESPLPVILANHYLL	VPFVLANPITVGVETK	EISQRIILALFWVETH	ASEP-----		
2	2A1C	LDPIVAVMEQVYLL	LPFVINSPIIYGAKTK	QIRTVILAMFKISCD	KDIDAGQNT		
3	HPRAJ70	LHPIVAVMEQVYLL	LPFVINSPIIYGAKTK	QIRTVILAMFKISCD	KELQAVGSK		

FIG. 3

GATCAAACTTCTTTCCATTTCAGAGTCCTCTGATTTCAGATTTAATGTTAACATTTTGGAGACAGTATTCAGAAAAA
AATTTCTTAATAAAATACAACTCAGATCCTTCAAATATGAACTGGTTGGGGAATCTCCATTTTTCAATATTATTT
TCCTCTTTGTTTTCTTGCTACGTATAATTATTAATATCCTGACTAGGTTGTGGTTGGAGGGTTATTACTTTTCATTTA
CATGCACTCCAAATCTAACTGCTTCTACTGATGGTTTACAGCATTCTGAGATAAGAAATGGTACATCTAGACAACATT
TGCCAAAGGCCTAAGCACAGCAAGGAAAATAAACACAGAAATATAATAAAATGAGATAATCTAGCTTAAACATATACT
TCCTCTTTAGAACTCCCAACCACATTTGGATC

FIG. 4

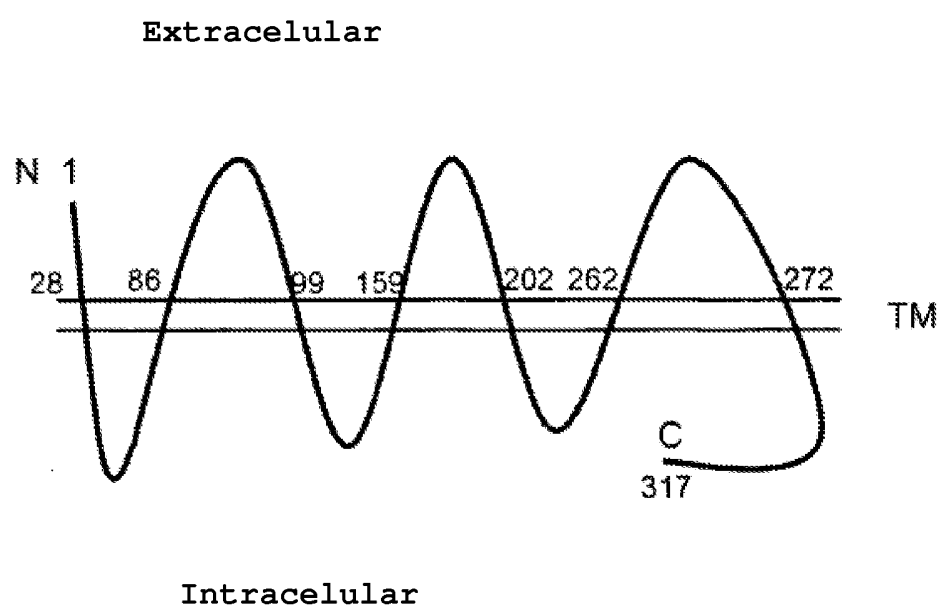


FIG. 5A

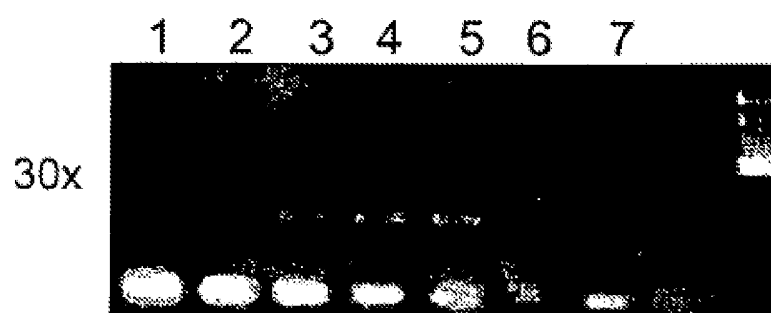


FIG. 5B

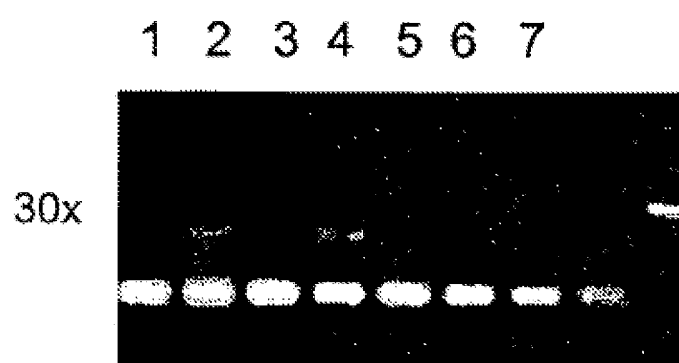


FIG. 6A

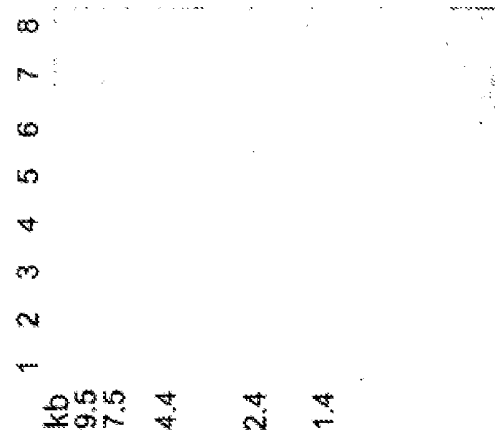


FIG. 6B

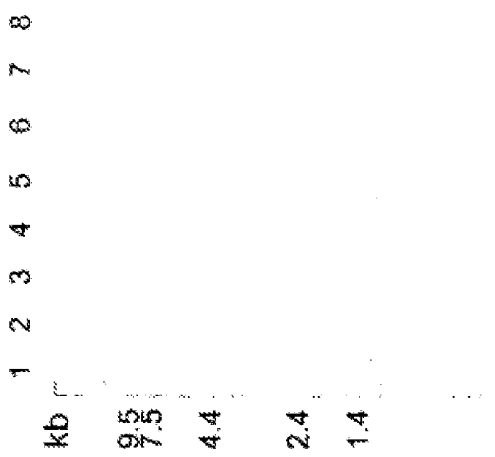


FIG. 6C

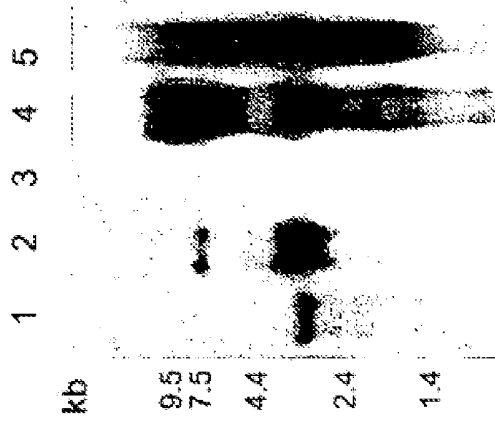


FIG. 7

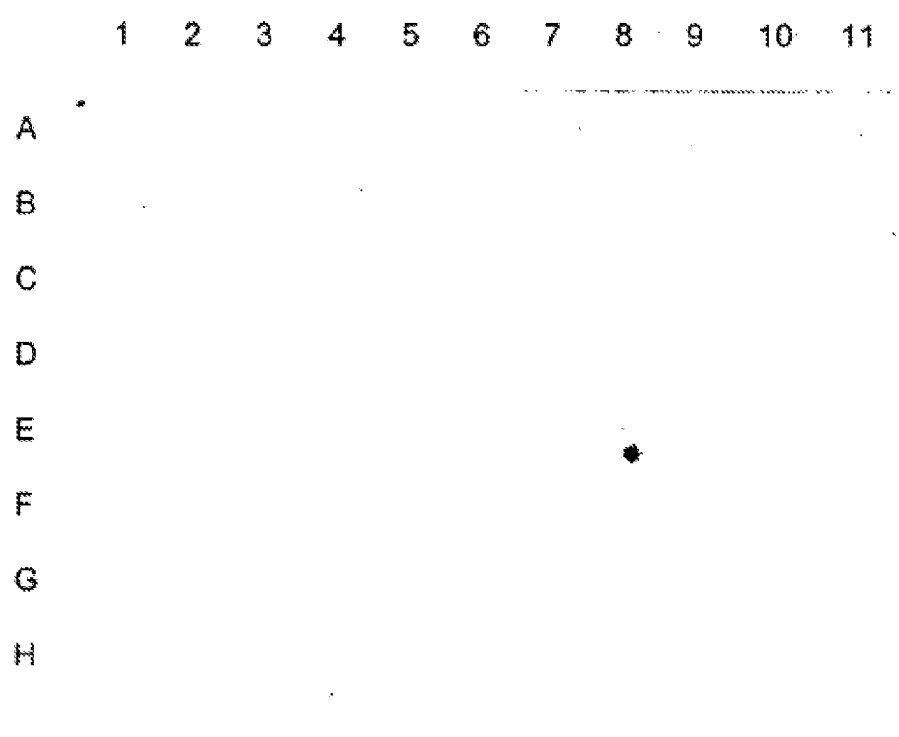


FIG. 8A

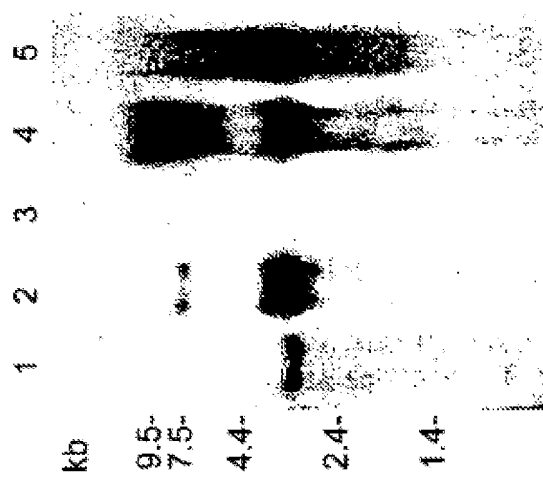


FIG. 8B

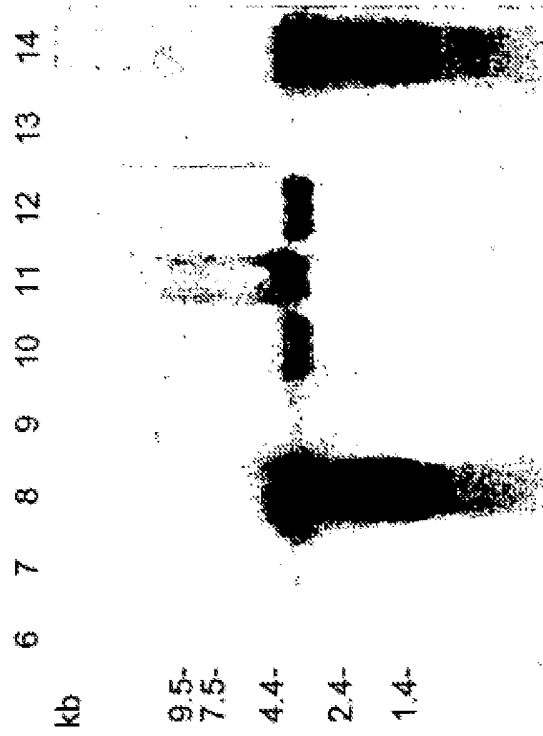


Figura 9A

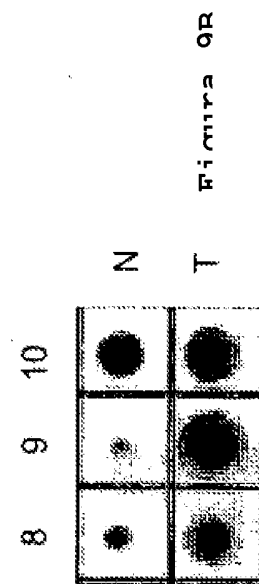
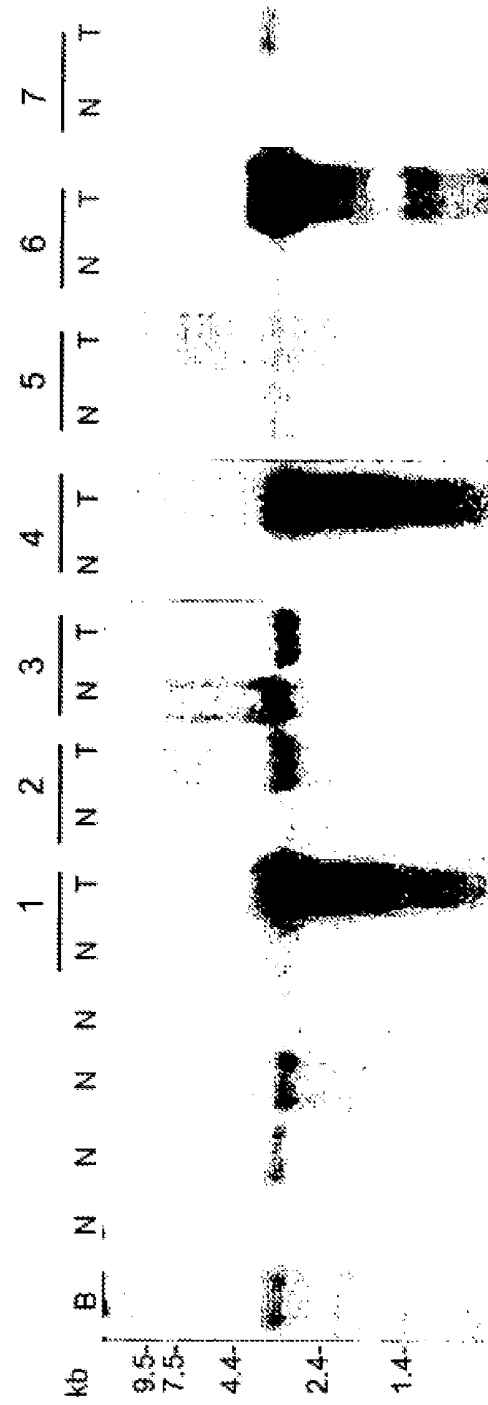


Figura 10

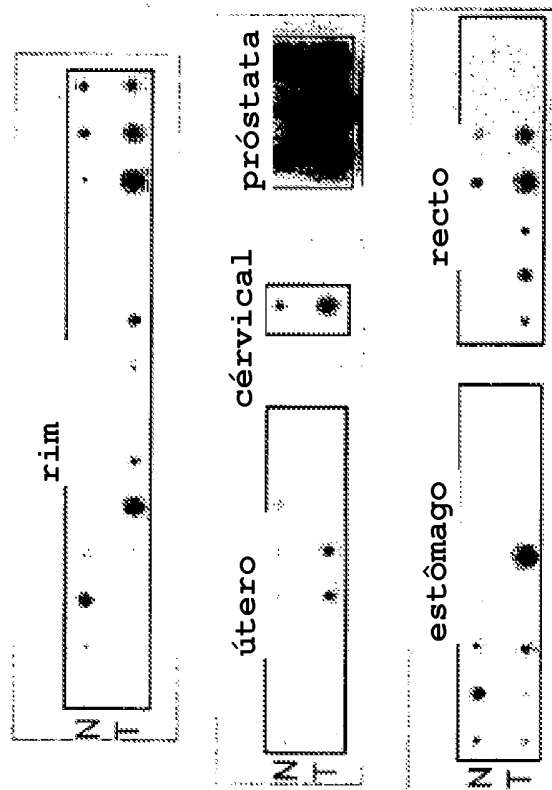


Figura 11A



Figura 11B

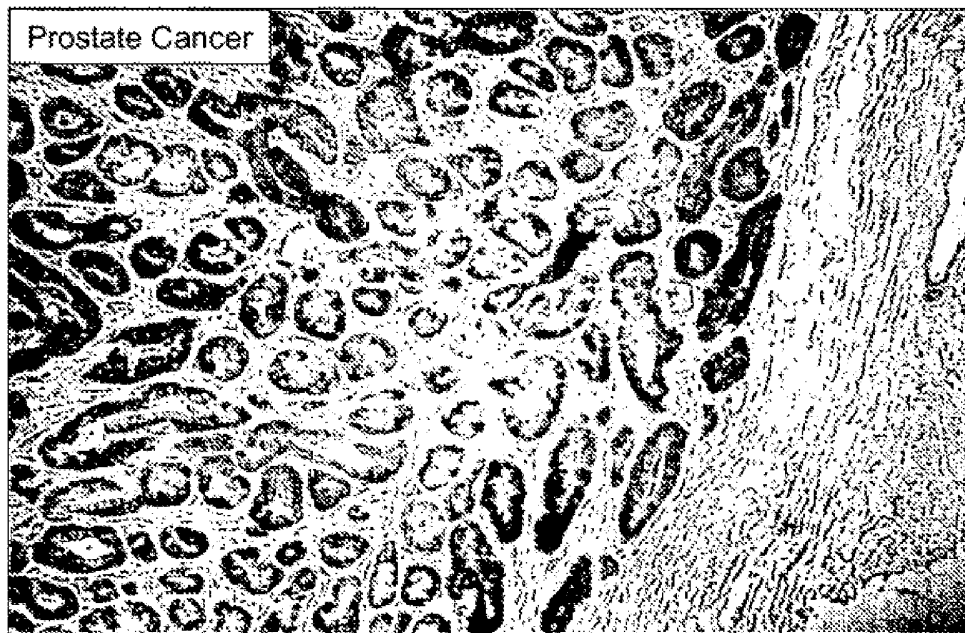


Figura 12A

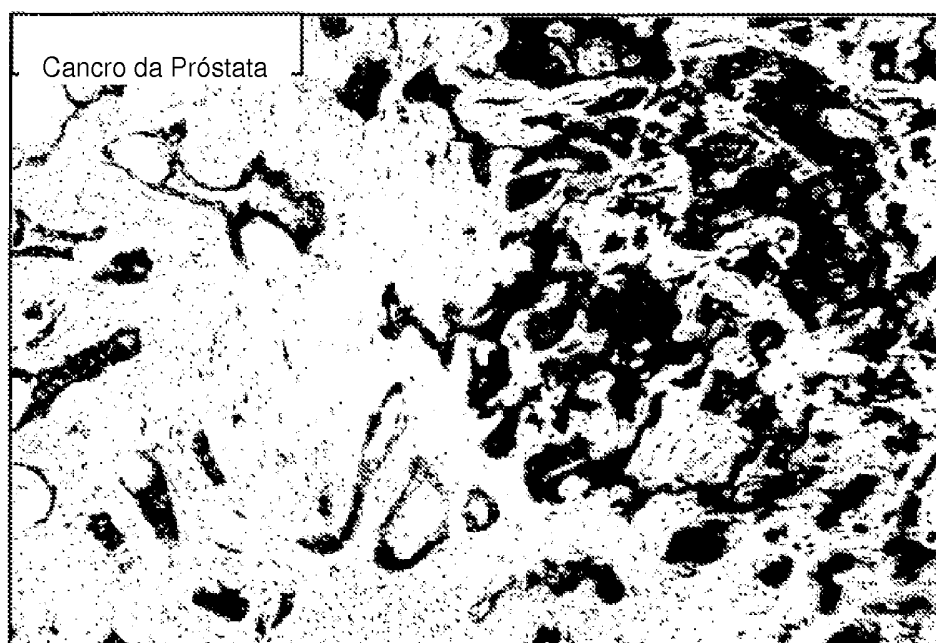


Figura 12B

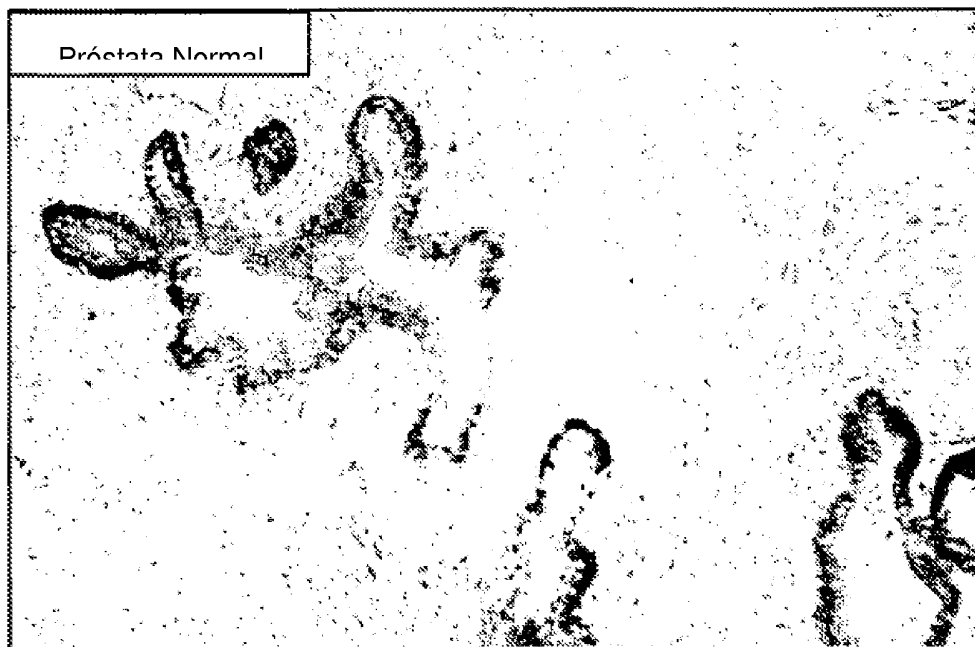


FIG. 13A

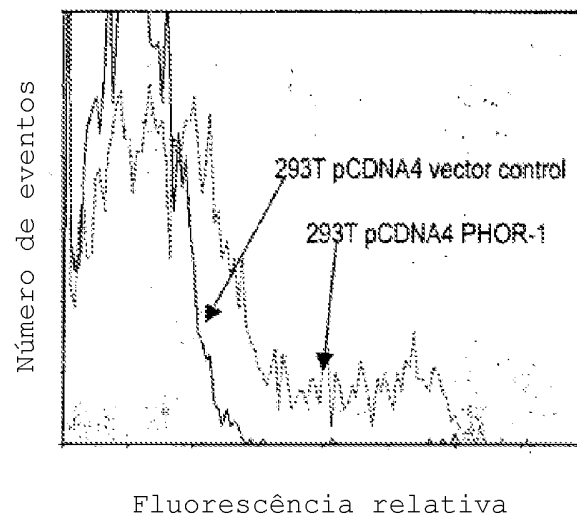


FIG. 13B

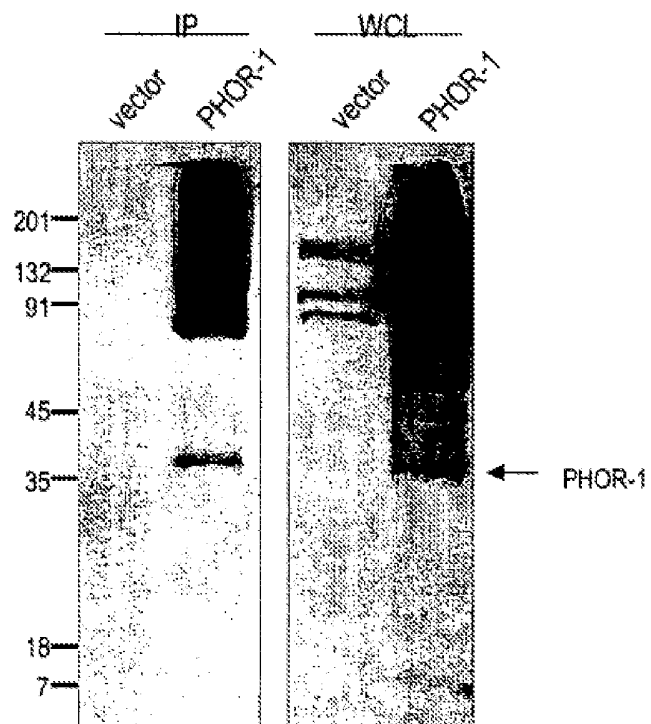


Fig. 14B

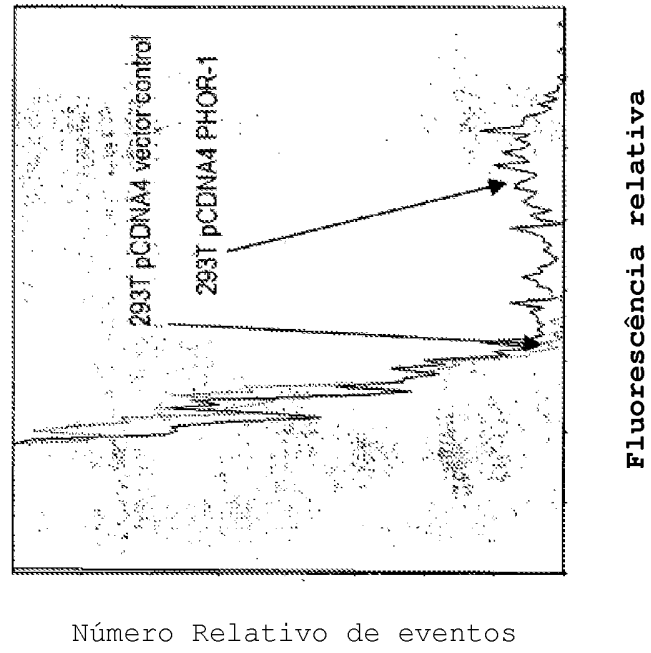


Fig. 14A

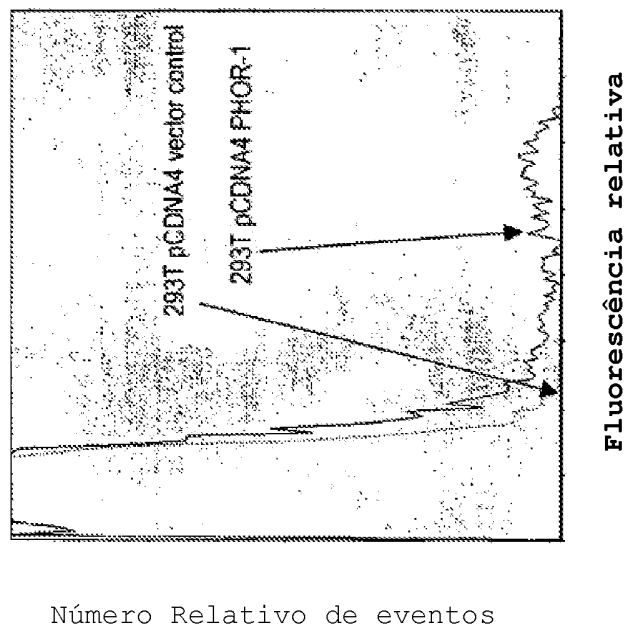


Fig. 15

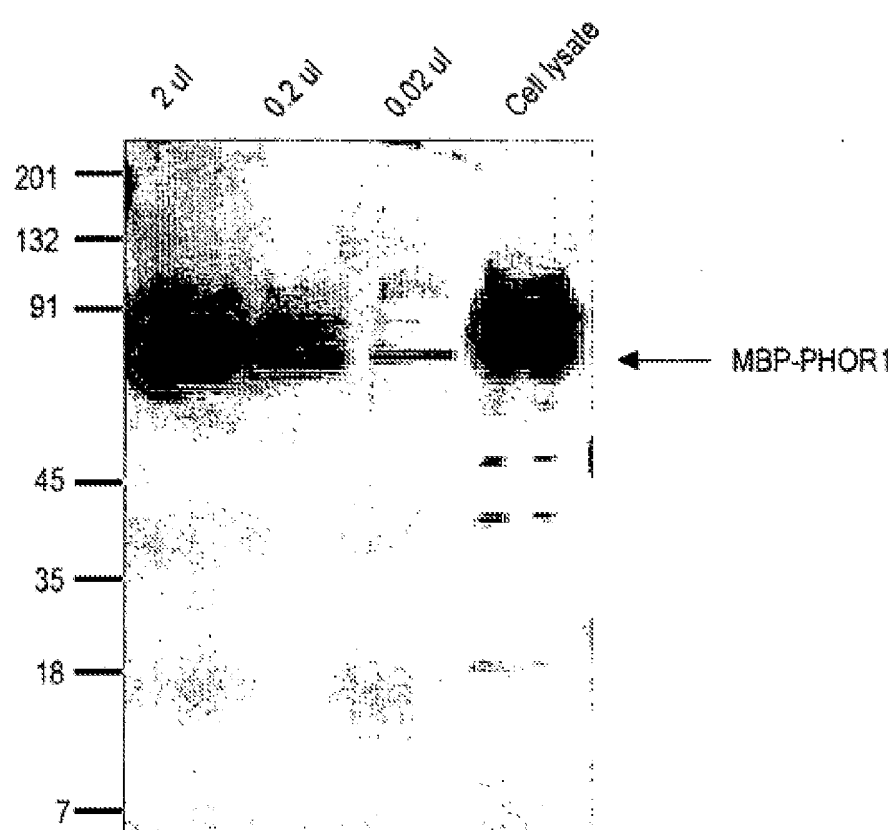


Fig. 16B

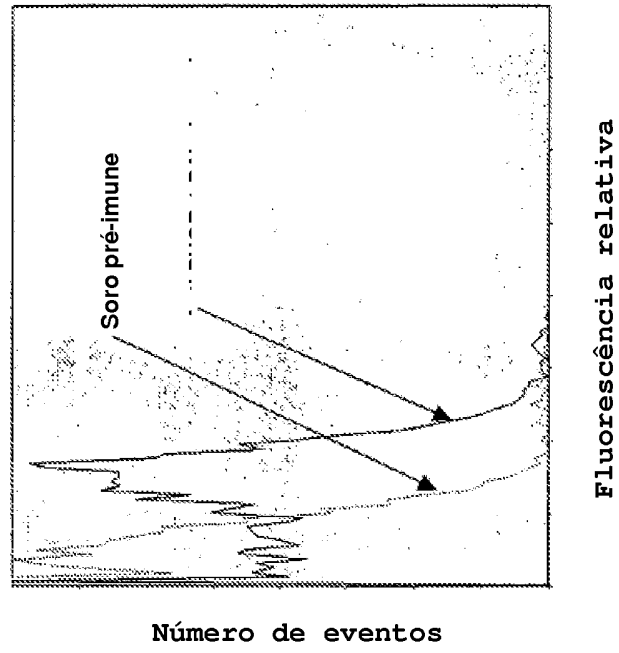


Fig. 16A

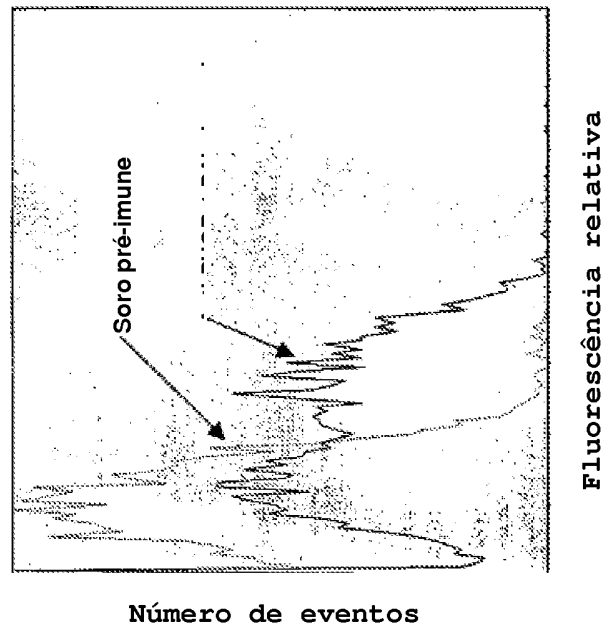




FIG. 17

FIG. 18A

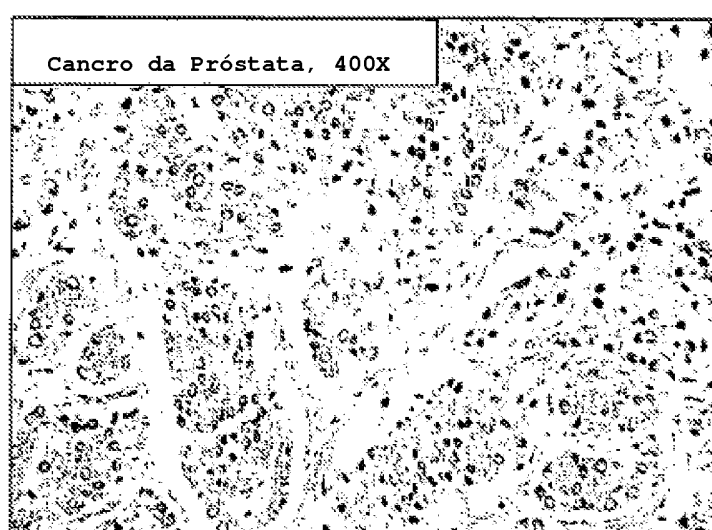


FIG. 18B

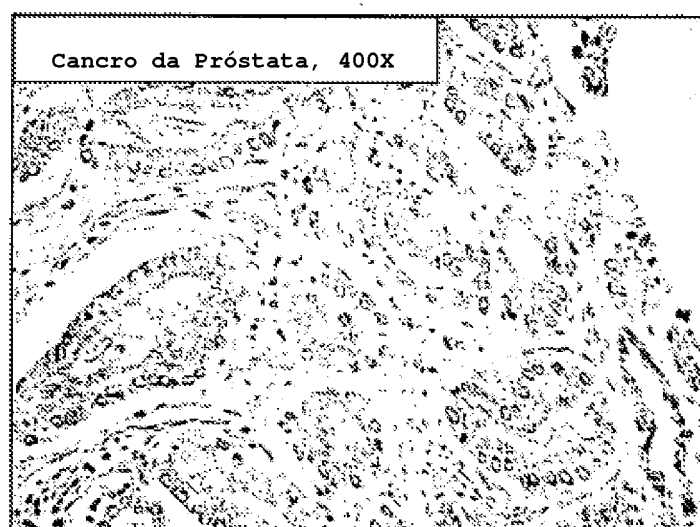


FIG. 18C



FIG. 18D

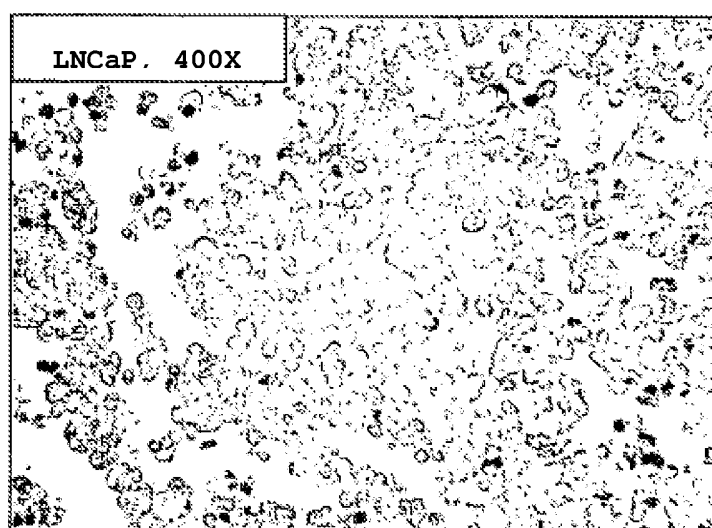


FIG. 18E

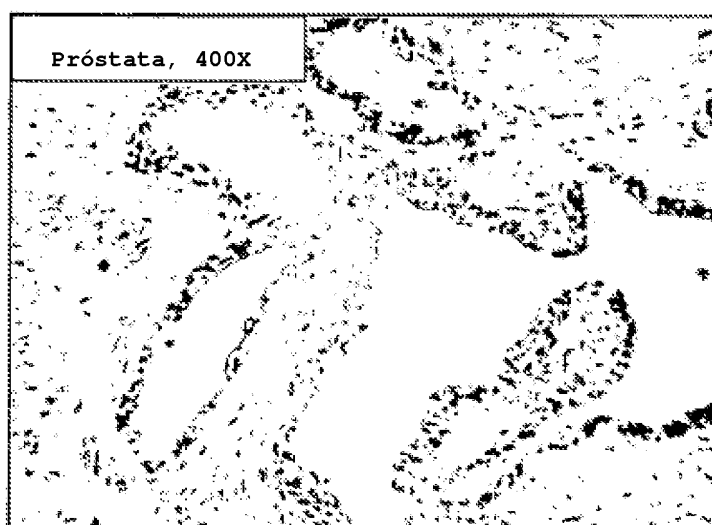


FIG. 18F

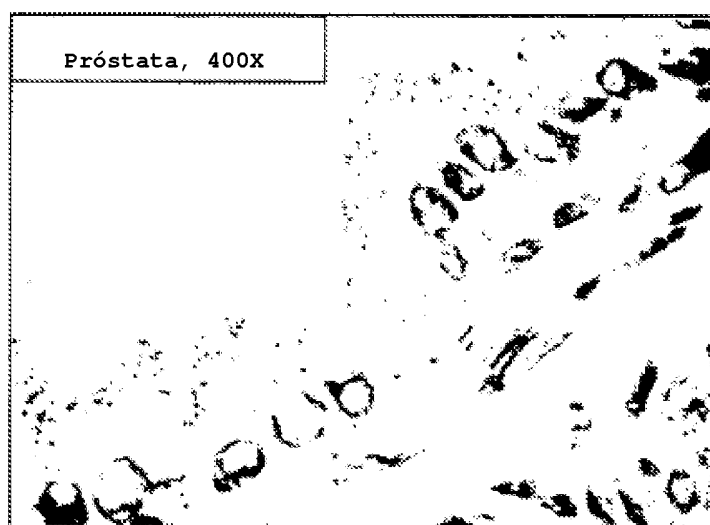


FIG. 19B

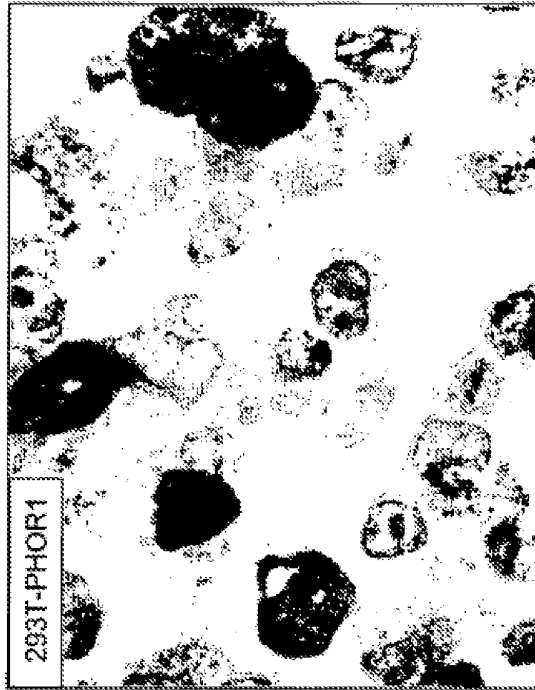


FIG. 19A

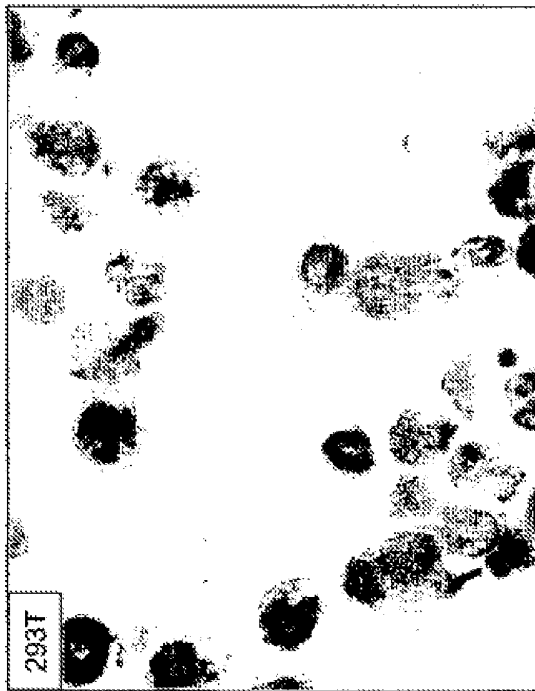


FIG. 19D

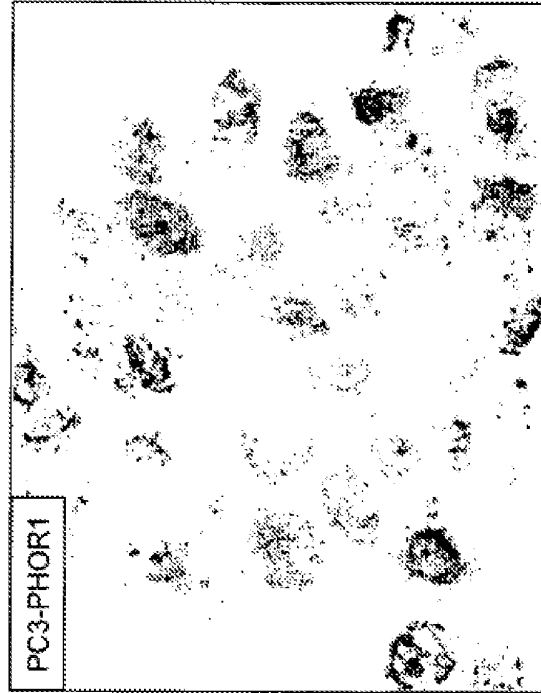


FIG. 19C

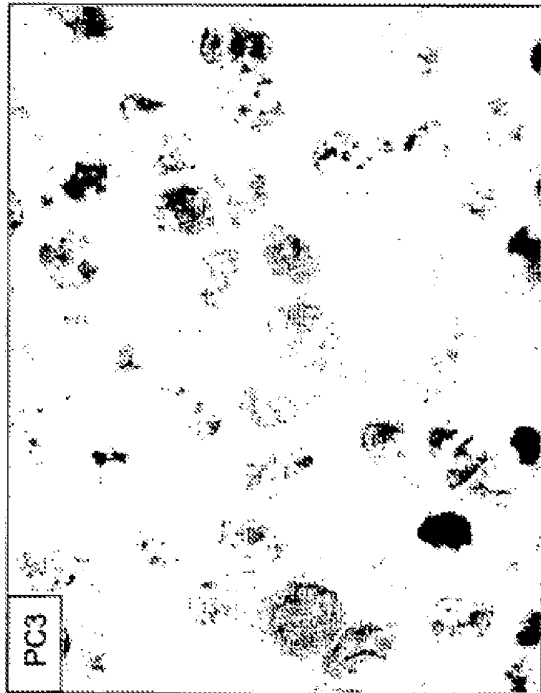


FIG. 19E

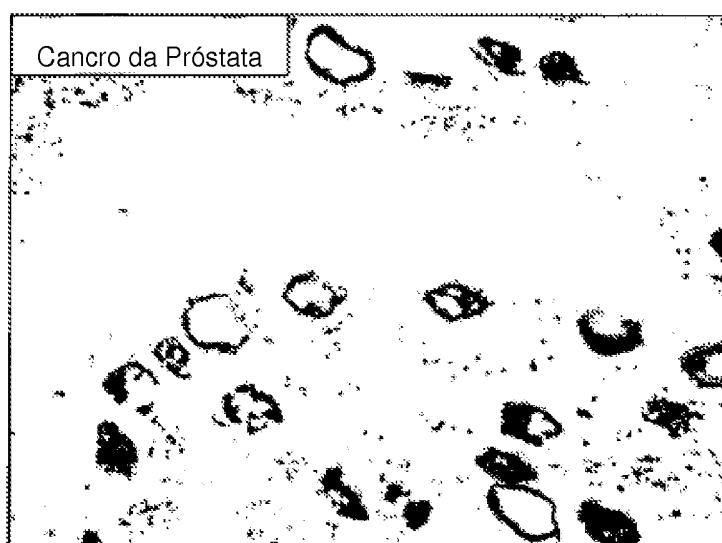


FIG. 19F

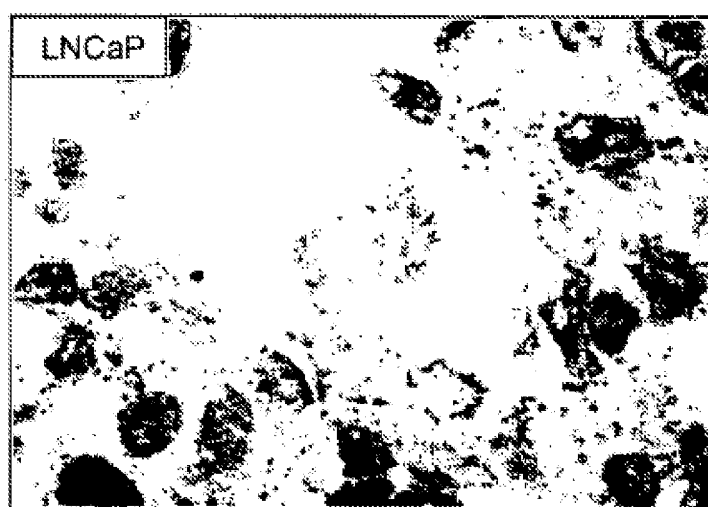


FIG. 20A

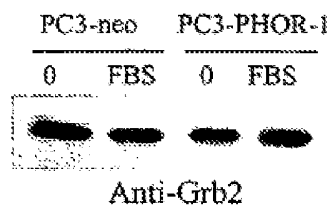
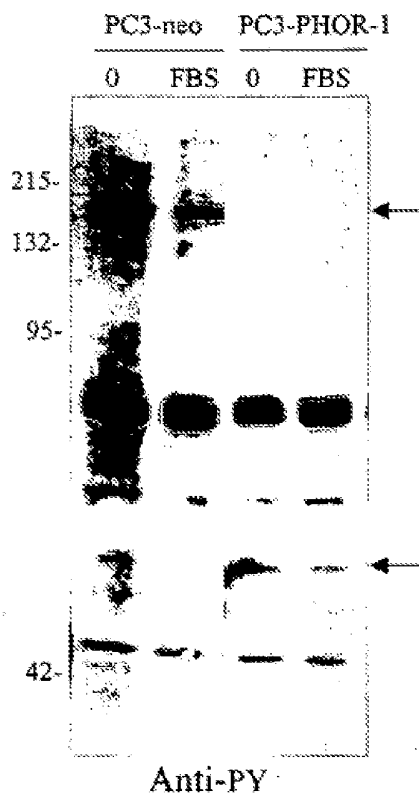


FIG. 20C

FIG. 20B

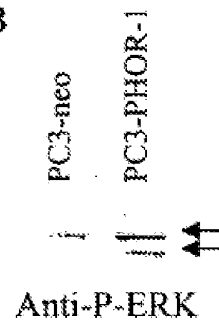


FIG. 20D

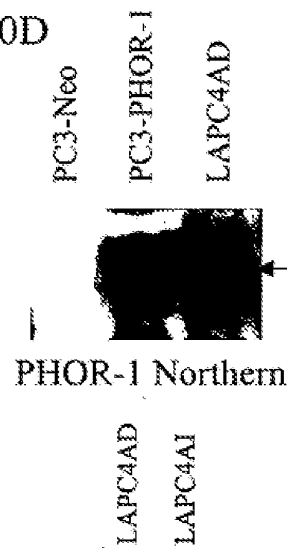
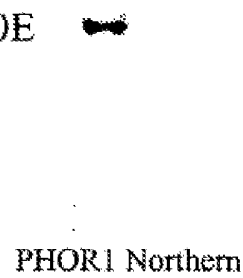


FIG. 20E



Neo

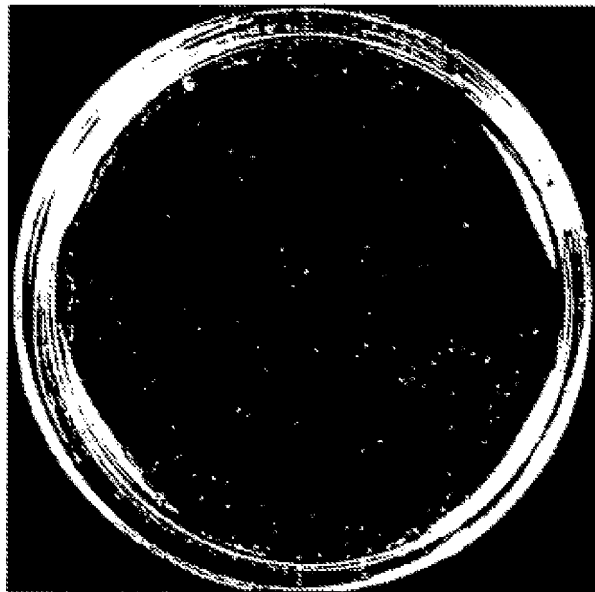


Fig. 21A

PHOR1

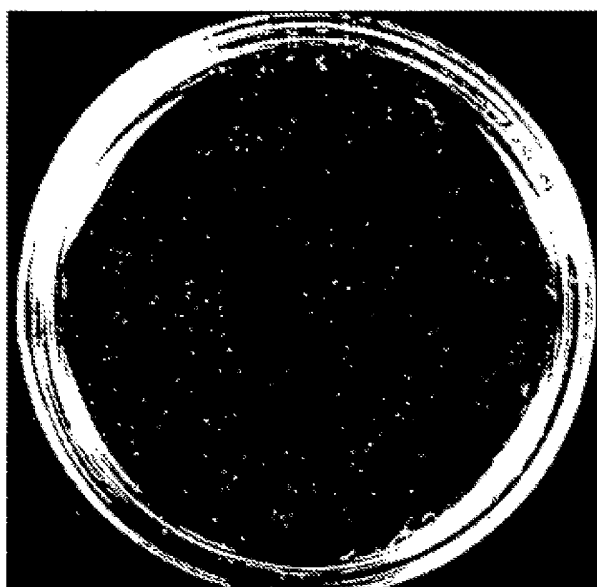


Fig. 21B

Ras

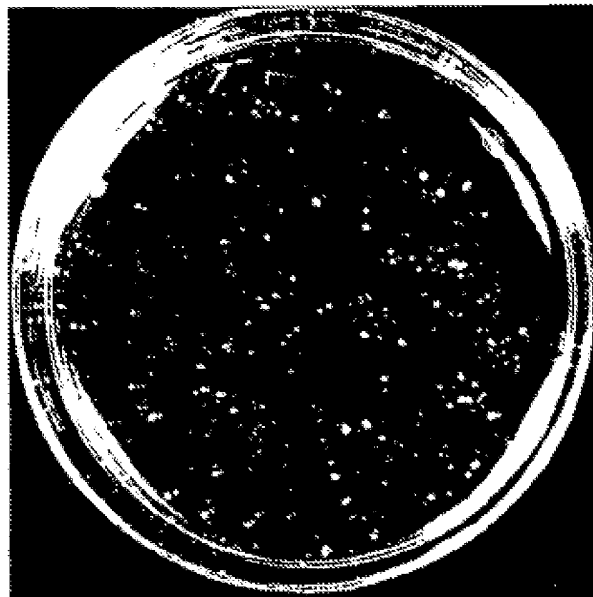


Fig. 21C

FIG. 22

```

      9      18      27      36      45      54
5' GCT GTG GCC ATG TTT ATT GGA GTG TTG GAT CTA TTC TTT ATC ATC CTA TCT TAT
   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   A V A M P I G V L D L F F I I L S Y

      63      72      81      90      99      108
   ATC TTT ATC CTT CAG GCA GTT CTA CAA CTC TCC TCT CAG GAG GCC CGC TAC AAA
   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   I F I L Q A V L Q L S S Q E A R Y K

      117      125      135      144      153      162
   GCA TTT GGG ACA TGT GTC TCT CAC ATA GGT GCC ATC TTA GCC TTC TAC ACA CCT
   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   A F G T C V S H I G A I L A F Y T P

      171      180      189      198      207      216
   TCA GTC ATC TCT TCA GTC ATG CAC CGT GTG GCC CGC TGT GCT GTG CCA CAC GTC
   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   S V I S S V M H R V A R C A V P H V

      225      234      243      252      261      270
   CAC ATT CTC CTC GCC AAT TTC TAT CTG CTC TTC CCA CCC ATG GTC AAT CCC ATC
   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   H I L L A N F Y L L F P P M V N P I

      279      288      297      306      315      324
   ATC TAT GGC GTT AAG ACC AAG CAG ATC CGT GAC AGT CTT GGG AGT ATT CCT GAG
   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   I Y G V K T K Q I R D S L G S I P E

      333      342      351      360      369      378
   AAA GGA TGT CTC AAT AGA GAG TGA GGA ATA AGT GGA AAA AGA CTG GGG CCC AGT
   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   K G C V N R E *

      387      396      405      414      423      432
   GAA TGC TGT AGT GGG CCA GGG CTG TGC TGA GAG TAG ATG GGT CCT AGA CTC CAC
   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   441      450      459      468      477      486
   GTT TAG TTC TTT TCT TGT ATT ATG AAA AGA ATA AAT GAT GTC CTG AAG CTC AGA
   --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
   495
   AAA AAA AAA AAA AAA 3'
   --- --- --- --- ---

```

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- WO 9906550 A
- US 5756309 A
- WO 9639435 A
- US 4840835 A
- US 4496689 A
- US 4301144 A
- US 4870417 A
- US 4791192 A
- US 4179337 A
- US 5428130 A
- WO 9824893 A, Kucherlapati and Jakobovits
- US 4975287 A
- US 4736866 A
- US 4870009 A
- US 5382510 A
- US 5952179 A
- US 5955280 A
- US 5825523 A
- US 5846722 A
- US 6004746 A
- US 5723288 A
- US 5733731 A
- US 5928868 A
- US 5919652 A
- WO 9816628 A, Sawyers
- GB 2211504 A
- US 60157902 B

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- KLEIN et al. *Nat. Med.*, 1997, vol. 3, 402
- SU et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 93, 7252
- REITER et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95, 1735
- HUBERT et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, vol. 96, 14523
- BEPLER et al. *Genomics*, January 1999, vol. 55, 164-175
- SAMBROOK et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- AUSUBEL et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley Interscience Publishers, 1995
- SAMBROOK et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, 1989
- ALTSCHUL et al. *Methods in Enzymology*, 1996, vol. 266, 460-480, <http://blast.wustl.edu/blast/RE-ADME.html>
- MARROGI et al. *J. Cutan. Pathol.*, 1999, vol. 26 (6), 369-378
- IRIZARRY et al. *Nature Genetics*, 2000, vol. 26 (2), 223-236
- Antisense Inhibitors of Gene Expression. JACK COHEN. OLIGODEOXYNUCLEOTIDES. CRC Press, 1989
- *Synthesis*, 1988, vol. 1, 1-5
- IYER, R. P. et al. *J. Org. Chem.*, 1990, vol. 55, 4893-4898
- IYER, R. P. et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, vol. 112, 1253-1254
- PARTRIDGE et al. *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 1996, vol. 6, 169-175
- L. A. COUTURE ; D. T. STINCHCOMB. *Trends Genet.*, 1996, vol. 12, 510-515
- RAMING et al. *Nature*, 1993, vol. 361, 353
- MALNIC et al. *Cell*, 1999, vol. 96, 713
- SIMON et al. *Science*, 1991, vol. 252, 802
- LUTTRELL et al. *Science*, 1999, vol. 283, 655
- LUTTRELL et al. *Curr Opin Cell Biol.*, 1999, vol. 11, 177
- PITCHER et al. *Ann. Rev. Biochem.*, 1996, vol. 67, 553
- BREER. *Ciba Found Symp.*, 1993, vol. 179, 97
- BRUCH. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 1996, vol. 113, 451
- SAMBROOK, J. et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, 1989
- *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley and Sons, 1995
- *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995
- MULLER et al. *MCB*, 1991, vol. 11, 1785
- CARTER et al. *Nucl. Acids Res.*, 1986, vol. 13, 4331
- ZOLLER et al. *Nucl. Acids Res.*, 1987, vol. 15, 6487
- WELLS et al. *Gene*, 1985, vol. 34, 315
- WELLS et al. *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, 1986, vol. 317, 415

- CREIGHTON. *The Proteins*. W.H. Freeman & Co,
- CHOTHIA. *J. Mol. Biol.*, 1976, vol. 159, 1
- Antibodies: A Laboratory Manual. CSH Press, 1988
- HARLOW. *Antibodies*. Cold Spring Harbor Press, 1989
- JONES et al. *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525
- RIECHMANN et al. *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327
- VERHOEYEN et al. *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536
- CARTER et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 89, 4285
- SIMS et al. *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2296
- VAUGHAN et al. *Nature Biotechnology*, 1998, vol. 16, 535-539
- Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications. Nottingham Academic, 1993, 45-64
- BURTON ; BARBAS. *Human Antibodies from combinatorial libraries. Id.*, 65-82
- JAKOBOVITS. *Exp. Opin. Invest. Drugs*, 1998, vol. 7 (4), 607-614
- Cancer: Principles and Practice of Oncology. VITETTA, E.S. et al. Immunotoxin therapy. J.B. Lippincott Co, 1993, 2624-2636
- CARON et al. *J. Exp. Med.*, 1992, vol. 176, 1191-1195
- SHOPE. *J. Immunol.*, 1992, vol. 148, 2918-2922
- WOLFF et al. *Cancer Res.*, vol. 53, 2560-2565
- THOMAS ; CAPECCHI. *Cell*, 1987, vol. 51, 503
- Li et al. *Cell*, 1992, vol. 69, 915
- BRADLEY. *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*. IRL, 1987, 113-152
- Current Protocols In Molecular Biology 1995
- DE MARZO et al. *Am. J. Pathol.*, 1999, vol. 155 (6), 1995-1992 [0100]
- BROOKS et al. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 1998, vol. 7, 531-536
- LETHE et al. *Int. J. Cancer*, 1988, vol. 76 (6), 903-908
- Current Protocols In Molecular Biology
- CARSTENS et al. *Oncogene*, 1997, vol. 15 (250), 3059-3065
- THOMAS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 5201-5205
- VERKAIK et al. *Urol. Res.*, 1997, vol. 25, 373-384
- GHOSSEIN et al. *J. Clin. Oncol.*, 1995, vol. 13, 1195-2000
- HESTON et al. *Clin. Chem.*, 1995, vol. 41, 1687-1688
- BOCKING et al. *Anat. Quant. Cytol.*, 1984, vol. 6 (2), 74-88
- EPTSEIN. *Hum. Pathol.*, February 1995, vol. 26 (2), 223-9
- THORSON et al. *Mod. Pathol.*, 1998, vol. 11 (6), 543-51
- BAISDEN et al. *Am. J. Surg. Pathol.*, 1999, vol. 23 (8), 918-24
- MOON et al. *PNAS*, 1999, vol. 96 (25), 14605-14610
- BREER et al. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1998, vol. 855, 175-181
- SINNETT-SMITH et al. *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275 (39), 30644-30652
- HAMILTON BJ et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, vol. 261, 648-51
- VANDENEYDE ; BOON. *Int J Clin Lab Res.*, 1997, vol. 27, 81-88
- DURRANT. *Anticancer Drugs*, 1997, vol. 8, 727-733
- REYNOLDS et al. *Int J Cancer*, 1997, vol. 72, 972-976
- ARLEN et al. *Crit. Rev. Immunol.*, 1998, vol. 18, 133-138
- OZAKI et al. *Blood*, 1997, vol. 90, 3179-3186
- TSUNENARI et al. *Blood*, 1997, vol. 90, 2437-2444
- KASPRZYK et al. *Cancer Res.*, 1992, vol. 52, 2771-2776
- FUNAKOSHI et al. *J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol.*, 1996, vol. 19, 93-101
- ZHONG et al. *Leuk. Res.*, 1996, vol. 20, 581-589
- MOUN et al. *Cancer Res.*, 1994, vol. 54, 6160-6166
- VELDERs et al. *Cancer Res.*, 1995, vol. 55, 4398-4403
- SHEPARD et al. *J. Clin. Immunol.*, 1991, vol. 11, 117-127
- RICHARDSON ; MARASCO. *TIBTECH*, 1995, vol. 13
- RICHARDSON et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 92, 3137-3141
- BEERLI et al. *J. Biol. Chem.*, 1994, vol. 269, 23931-23936
- DESHANE et al. *Gene Ther.*, 1994, vol. 1, 332-337
- KLEIN et al. *Nature Medicine*, 1997, vol. 3, 462-468
- Remington's Pharmaceutical Sciences. 1980
- HODGE et al. *Int. J. Cancer*, 1995, vol. 63, 231-237
- FONG et al. *J. Immunol.*, 1997, vol. 159, 3113-3117
- RESTIFO. *Curr. Opin. Immunol.*, 1998, vol. 8, 658-663
- FALK et al. *Nature*, 1991, vol. 351, 290-8
- HUNT et al. *Science*, 1992, vol. 255, 1261-3

- PARKER et al. *J. Immunol.*, 1992, vol. 149, 3580-7
- PARKER et al. *J. Immunol.*, 1994, vol. 152, 163-75
- XUE et al. *Prostate*, 1997, vol. 30, 73-8
- PESHWA et al. *Prostate*, 1998, vol. 36, 129-38
- TJOA et al. *Prostate*, 1996, vol. 28, 65-69
- MURPHY et al. *Prostate*, 1996, vol. 29, 371-380
- ARTHUR et al. *Cancer Gene Ther.*, 1997, vol. 4, 17-25
- HENDERSON et al. *Cancer Res.*, 1996, vol. 56, 3763-3770
- RIBAS et al. *Cancer Res.*, 1997, vol. 57, 2865-2869
- ASHLEY et al. *J. Exp. Med.*, 1997, vol. 186, 1177-1182
- WAGNER et al. *Hybridoma*, 1997, vol. 16, 33-40
- FOON et al. *J Clin Invest*, 1995, vol. 96, 334-342
- HERLYN et al. *Cancer Immunol Immunother*, 1996, vol. 43, 65-76
- KLEIN et al. *Nature Med.*, 1997, vol. 3, 462-468
- CRAFT et al. *Cancer Res.*, 1999, vol. 59, 5030-5035
- LIEBMANN C ; BOHMER FD. *Curr Med. Chem.*, 2000, vol. 7, 911
- MAUDSLEY S ; PIERCE KL ; ZAMAH AM ; MILLER WE ; AHN S ; DAAKA Y ; LEFKOWITZ RJ ; LUTTRELL LM. *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, 9572
- GREULICH H ; ERIKSON RL. *J Biol Chem.*, 1998, vol. 273, 13280
- BIRNBAUMER L. *Cell*, 1992, vol. 71, 1069
- WALTER et al. *Nat. Genetics*, 1994, vol. 7, 32
- LAI et al. *Clin. Cancer Res.*, 2000, vol. 6 (9), 3172-6
- OYA ; SCHULZ. *Br. J. Cancer*, 2000, vol. 83 (5), 626-31
- SVAREN et al. *J. Biol. Chem.*, 12 September 2000
- EVANS et al. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1994, vol. 171 (4), 1055-1057
- WELCH et al. *Int. J. Cancer*, vol. 43, 449-457